



CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES *BORRELIA*

RAPPORT D'ACTIVITÉ 2012-2015

Centre National de Référence des *Borrelia*

Laboratoire de Bactériologie

Plateau technique de microbiologie

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Responsable :

Pr Benoît Jaulhac, MD., PhD

Expertise médicale :

Dr Sylvie de Martino MD., PhD

Surveillance vectorielle :

Mme Nathalie Boulanger PharmD., PhD

SOMMAIRE

1.DEScriptif DES CAPACITES DU LABORATOIRE	4
1.1 Organisation du CNR Borrelia	4
1.2 Les moyens du laboratoire affectés au CNR	4
1.2.1.Les ressources humaines :	4
1.2.2.Les équipements et la logistique.....	5
1.3 Bref descriptif des thématiques de recherche du laboratoire dans le domaine d'expertise du CNR.....	7
1.3.1.Mise au point et évaluation d'une technique de diagnostic précoce des biopsies cutanées d'érythème migrant par spectrométrie de masse	7
1.3.2.Analyse de l'organotropisme de Borrelia dans la peau par une approche protéomique de Borrelia.....	8
1.3.3.Mise au point d'une technique de détection de Borrelia dans les tiques par spectrométrie de masse	9
1.3.4.Aspects épidémiologiques de la borreliose de Lyme	9
1.4 Les capacités techniques du CNR Borrelia	10
1.4.1.Liste des techniques disponibles pour le diagnostic et l'identification	10
1.4.2.Liste des techniques disponibles pour le typage.....	11
1.4.3.Collections de souches, immun-sérums disponibles	11
1.4.4.Bases de données de séquences.....	13
2.ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES	13
2.1 Les activités au titre de l'expertise microbiologique.....	14
2.1.1.Techniques développées ou en développement durant la mandature.....	14
2.1.2.Travaux d'évaluation de trousse commerciales	16
2.1.3.Techniques transférées vers d'autres laboratoires au cours de la mandature	21
2.1.4.Expertise en sérologie de Borrelia (anciennement B. burgdorferi s.l) durant la mandature	21
2.1.5.Envois extérieurs de matériel biologique par le CNR Borrelia	41
2.2 Information, formation et conseil aux professionnels ou aux autorités de santé.....	43
2.2.1 Enseignement sur la thématique	43
2.2.2 Formation médicale continue aux professionnels de santé	44
2.2.3 Information médias « grand public » et site internet	44
2.2.4.Organisation annuelle d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ) proposé par le CNR.....	45
2.2.5 Participation à l'organisation par l'ANSM d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ)	47
2.2.6 Guides élaborés.....	50

2.3	Contribution à la surveillance épidémiologique.....	51
2.3.1	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections humaines à Borreliella et autres pathogènes transmis par Ixodes ricinus	51
2.3.2	Surveillance du vecteur Ixodes ricinus.....	62
2.4	Contribution à l'alerte.....	77
3.	LISTE DES PUBLICATIONS	78
3.1	Publications nationales (11).....	78
3.2	Publications internationales (25)	79
3.3	Communications nationales (12).....	81
3.4	Communications internationales (18).....	82
3.5	Conférences sur invitation (50)	84
3.6	Brevets (2)	88
3.7	Contribution à des chapitres ou des ouvrages	89
3.8	Contribution à des partenariats ou collaborations avec des structures ou instances nationales ou internationales	90
3.8.1	Membres de réseaux nationaux	90
3.8.2	Groupe européen EUCALB – ESGBOR.....	90
3.8.3	Participation à des réunions de l'ECDC.....	91
4.	DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE ET MISE EN OEUVRE AU LABORATOIRE	91
5.	DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE	96
5.1	Procédures de respect de la conformité à la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractère personnel.....	96
5.2	Capacité du laboratoire à mettre en oeuvre une transmission régulière et informatisée de données vers l'InVS.....	97

1. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE

1.1 Organisation du CNR *Borrelia*

- L'activité d'**expertise microbiologique** (culture, sérologie, biologie moléculaire) sera assurée par les Drs. Sylvie de Martino et Benoit Jaulhac aidés d'un vacataire biologiste médical, le Dr. Pierre Zachary ainsi que par une ingénieure (Laurence Zilliox) et une technicienne à recruter. L'activité de sérologie *Borrelia* sera quand à elle assurée à tour de rôle par 0,7 ETP d'un pool de 4 techniciennes du plateau technique de microbiologie, toutes habilitées aux différentes techniques utilisées
- L'activité de **conseil scientifique** sera assurée par les Drs. Sylvie de Martino, Benoit Jaulhac et Nathalie Boulanger (pour la partie vectorielle) afin d'assurer une relation quotidienne avec les médecins et biologistes notamment mais aussi les patients, très demandeurs depuis plusieurs années. Le conseil technique sera assuré par une technicienne. L'accueil téléphonique et la logistique des nombreuses demandes téléphoniques et mails sera assurée par un temps partiel de secrétariat.
- L'activité d'**épidémiologie humaine** sera assurée par les Drs Sylvie de Martino et Benoit Jaulhac. L'activité d'**épidémiologie vectorielle** sera assurée par le Dr Nathalie Boulanger assistée par une technicienne qui sera recrutée et formée pour ce projet. Laurence Zilliox participera aussi à cette activité.
- La mission d'**alerte** sera assurée par les Drs Sylvie de Martino et Benoit Jaulhac.

1.2 Les moyens du laboratoire affectés au CNR

1.2.1. Les ressources humaines :

Biologiste responsable :	Benoit Jaulhac	0,25 ETP
Biologistes médicaux :	Sylvie De Martino	0,20 ETP
	Pierre Zachary	0,1 ETP
Entomologiste médical :	Nathalie Boulanger	0,40 ETP
Ingénieure :	Laurence Zilliox	1 ETP
Technicien de laboratoire :		
pool mutualisé pour analyses médicales		0,715 ETP
	Danièle Napaolitano	0,8 ETP
Secrétariat :	pool mutualisé pour analyses médicales	0,17 ETP

1.2.2. Les équipements et la logistique

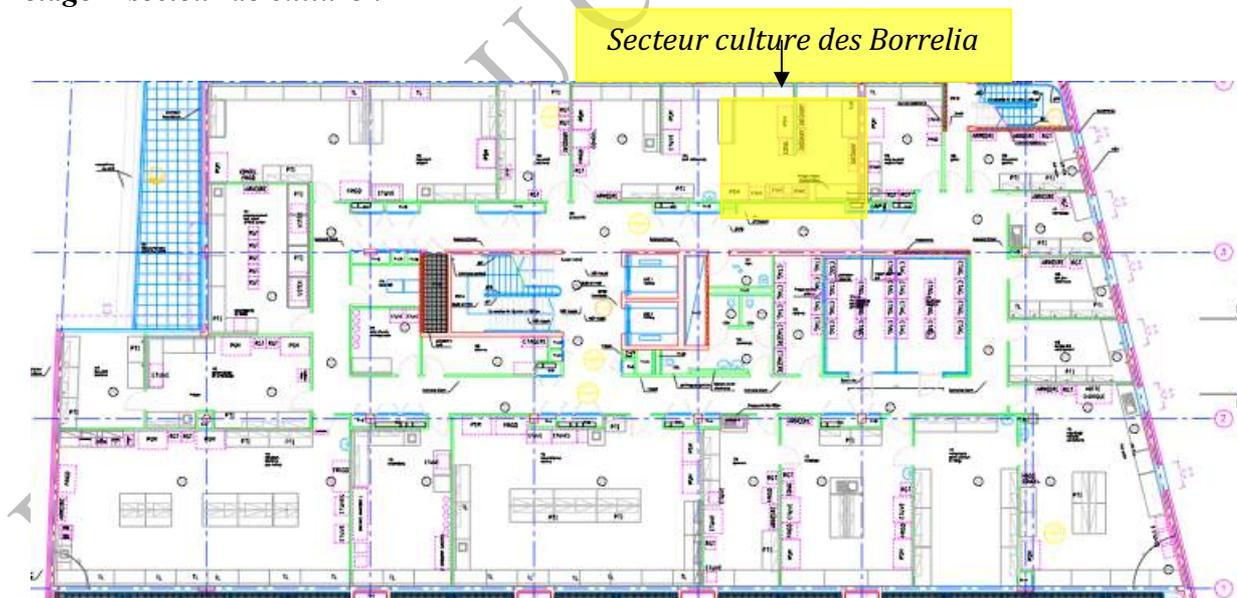
1.2.2.1. Surface des locaux, plan

Le CNR des *Borrelia* est situé dans des locaux au sein du Plateau Technique de Microbiologie (bâtiment de 3 500 m² utiles, ouvert à l'automne 2010), à proximité du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg. L'ensemble des équipements du CNR a été intégré dans les différents secteurs dédiés au sein de ces locaux (cf plans ci-dessous). Ces locaux sont conformes aux règles d'hygiène et de sécurité en vigueur. Toutes les cultures sont ainsi réalisées dans des pièces séparées en niveau LSB 2 avec contrôle des températures et des pressions d'air centralisées. Ce bâtiment possède des installations techniques munies de redondance et de sûreté de fonctionnement pour les opérateurs et pour l'environnement 24h sur 24. Il répond notamment aux exigences de l'accréditation des laboratoires.

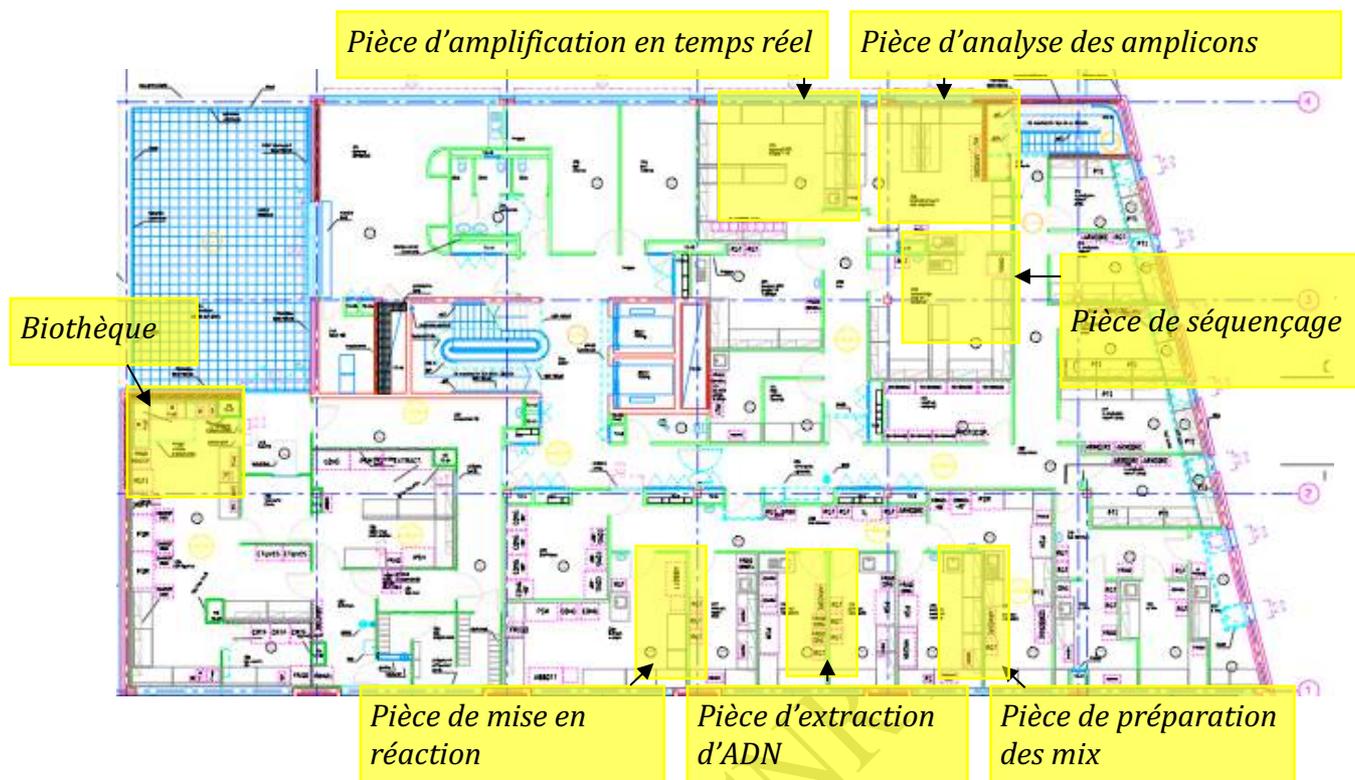
L'activité du CNR *Borrelia* s'effectue en fonction des analyses à réaliser dans les différents Secteurs Techniques d'Activité Partagée (STAP) présentés dans la fiche d'identité du laboratoire :

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

1^{er} étage - secteur de culture :



2^{ème} étage - secteur biologie moléculaire :



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

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

1.2.2.2. Principaux équipements sur le plateau technique

- PSM
- Etuves de culture microbiologique à 30°C , 33°C et à 37°C (avec ou sans enrichissement en CO_2) toutes équipées d'un système d'enregistrement en continu de la température.
- Microscopes dont un microscope à fond noir (Leica) et un à contraste de phase pour l'observation des *Borrelia* avec système d'enregistrement d'image.
- Loupe binoculaire (Leica) à lumière froide pour la dissection des tiques
- Réfrigérateurs à $+4^{\circ}\text{C}$, congélateurs à -30°C (conservation des sérums) et à -80°C (conservation des souches bactériennes, des ADN et des tiques). Une connexion à un système d'alerte centralisé en temps réel 24H/24 est en place.
- Deux automates pour ELISA (BEP III, BEP 2000)
- Un appareillage pour western-blot (Bio-Rad)
- Deux extracteurs d'acides nucléiques (Roche, BioMérieux)
- Trois appareils de PCR en temps réel (Roche Light Cycler 2.0 et 480, ABI 7500)

- Appareillage d'électrophorèse d'ADN
- Système d'acquisition d'images (Bio-Rad)
- Hotte à produit chimique
- Autoclave
- Séquenceur capillaire (ABI)
- Accès à une animalerie infectieuse agréée n° A 67 482 37.

1.3 **Bref descriptif des thématiques de recherche du laboratoire dans le domaine d'expertise du CNR**

Les différents axes de l'équipe de recherche (EA7290 : virulence bactérienne précoce : groupe *Borrelia*) sont les suivants :

- Analyse du rôle de la peau dans la transmission précoce de *Borrelia* et de son rôle potentiel dans la physiopathologie de la maladie,
- Analyse de la latence de *Borrelia* par une approche protéomique et de l'organotropisme de *Borrelia* pour la peau : application à un diagnostic tardif de la borréliose de Lyme
- Mise au point d'une technique de diagnostic précoce de *Borrelia* dans des biopsies cutanées par spectrométrie de masse
- Mise au point d'une technique de détection de *Borrelia* dans les tiques par spectrométrie de masse
- Analyse du rôle du microbiome cutané sur la transmission précoce de *Borrelia*
- >Développement d'un vaccin vétérinaire contre la borréliose de Lyme.
- Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme en zone d'endémie
- Mise au point d'un modèle de fièvres récurrentes à *Borrelia crocidurae*.

Nous ne présentons ici que les domaines de recherche appliquée.

1.3.1. *Mise au point et évaluation d'une technique de diagnostic précoce des biopsies cutanées d'érythème migrant par spectrométrie de masse*

Objectifs

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

Partenariats

Professeur Laurence Sabatier et deux étudiants de doctorat (Gilles Schnell et Amandine Bœuf), Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France

Cette étude est réalisée en collaboration avec le service d'Infectiologie (Prof CHRISTMANN et HANSMANN) et de Dermatologie (Prof D. LIPSKER) du CHU de Strasbourg, le CH de Mulhouse (Dr KIEFFER), le CH de Colmar (Dr MARTINOT), le CHU de Besançon, de Metz et de Reims.

Etat d'avancement

Nous avons mis au point une technique de diagnostic ciblée par protéomique, la SRM-MS/MS (Selected Reaction Monitoring / Mass spectrometry) sur modèle murin après infection intradermique à la seringue de *B. burgdorferi*.

Sur biopsies cutanées de souris, nous avons préalablement recherché l'ensemble des protéines bactériennes de *Borrelia* présentes par LC-MS/MS : 25 ont été identifiées. Parmi ces 25 protéines, deux ont été choisies et détectées spécifiquement par SRM-MS/MS dans la peau de souris. La méthode a été testée sur 3 biopsies d'érythème migrant de patients infectés par *B. afzelii*. Ces protéines ont été détectées chez les trois patients.

Un **PHRC interrégional** a été obtenu en 2016 pour la validation médicale de la méthode SRM-MS/MS et sa comparaison par rapport aux outils existants : « Borréliose de Lyme et diagnostic cutané précoce » (Etude HUS n°6084).

Ce travail a fait l'objet d'une publication :

Schnell G, Boeuf A, Westermann B, Jaulhac B, Lipsker D, Carapito C, Boulanger N, Ehret-Sabatier L. Discovery and targeted proteomics on cutaneous biopsies infected by Borrelia to investigate Lyme disease. Mol Cell Proteomics. 2015 Feb 24. pii: mcp.M114.046540 IF : 7,25.

1.3.2. Analyse de l'organotropisme de Borrelia dans la peau par une approche protéomique de Borrelia

Objectif

Mettre en évidence des protéines de *Borrelia* qui pourront servir de marqueurs d'infection active dans la phase disséminée de la borréliose.

Partenariats

Professeur Laurence Sabatier et deux étudiants de doctorat (Gilles Schnell et Benoit Westermann), Département des Sciences Analytiques Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, France

Etat d'avancement

B. burgdorferi ss a été injecté par deux voies d'inoculation, intradermique et intrapéritonéale chez la souris. Après dissémination, à 40 jours, des tiques sont déposées sur la peau. Elles deviennent positives quel que soit le protocole d'inoculation, en absence de bactériémie, soulignant le rôle de la peau comme site de persistance.

Des biopsies de souris ont été prélevées à 40 jours afin de rechercher des protéines de *Borrelia* par LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry). Des protéines bactériennes ont été identifiées dans la peau des souris infectées et pourraient donc constituer des marqueurs d'infection active de *Borrelia*. Nous avons plusieurs candidats intéressants à l'étude.

La 1ère étape du projet va consister, sur modèle murin, en la détermination de la liste des protéines candidates comme marqueurs d'infection active. Nous testerons ensuite cette technique

chez l'homme afin d'identifier des biomarqueurs de l'infection à *Borrelia* dans les infections disséminées et l'étudierons sur la peau et les organes distants (liquide céphalo-rachidien et liquide articulaire). Ces biomarqueurs pourraient constituer des candidats pour un nouveau diagnostic en protéomique ciblée (Selected Reaction Monitoring / Mass spectrometry). Ce travail fait l'objet d'une thèse de Doctorat, par Antoine GRILLON, AHU en bactériologie, actuellement en 3^{ème} année de thèse d'université.

1.3.3. *Mise au point d'une technique de détection de Borrelia dans les tiques par spectrométrie de masse*

Objectif

Mettre au point une technique rapide de détection des pathogènes dans les tiques collectées sur le terrain par protéomique en remplacement de la PCR.

Partenariats

Ce travail se fait en étroite collaboration avec l'équipe de recherche CNRS-URMITE de Marseille (Drs L. Almeras et P. Parola).

Etat d'avancement

En 2013, nous avons tenté de détecter *Borrelia* dans les tiques par une approche protéomique, visant la protéine OspA par Maldi-TOF. Peu concluant, nous avons entrepris la détection par une approche non ciblée, basée sur un profil global des protéines par spectrométrie de masse. Ce travail est fait actuellement par un master M2 (P. Boyer).

1.3.4. *Aspects épidémiologiques de la borréliose de Lyme*

Objectifs

- étude N+10 ans de la densité en vecteur
- évaluation des facteurs abiotiques sur la densité en nymphes
- évaluation du biotope et analyses statistiques associées

Partenariats

Partenariat avec l'ONF, avec la Faculté de Géographie de Strasbourg et avec Mickael Schaeffer (ingénieur biostatisticien au pôle de santé publique du CHU de Strasbourg)

Etat d'avancement

Afin de suivre l'évolution de la densité du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace, des campagnes de collectes sur le terrain ont été organisées depuis 2012 en réalisant une nouvelle exploration des sites investigués en 2003-2004 par l'ancien CNR *Borrelia*.

Ce travail fera l'objet d'une soumission : étude N+10 (par la Doctorante Valérie Goldstein)

De plus, certains facteurs biotiques et abiotiques pouvant influencer la densité vectorielle ont été analysés. La partie de l'étude sur les facteurs abiotiques fera l'objet d'une publication (V. Goldstein)

La soutenance de la thèse d'Université du Dr Valérie Goldstein, déjà diplômée de la faculté de pharmacie de Strasbourg, est prévue pour l'année 2017.

1.4 Les capacités techniques du CNR *Borrelia*

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

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

- **Examen microscopique** : après coloration de Giemsa
- **Culture** à partir du sang ou de tiques disséquées en milieu liquide BSK
- **Inoculation à l'animal** de sang infecté (souris) au sein d'une animalerie agréée
- **Amplification génique *in vitro*** :
 - PCR classique du genre *Borrelia* avec séquençage du produit amplifié pour identification de l'espèce. Cibles : gènes chromosomiques de l'ADNr 16 S et de la flagelline (Brahim H, EID, 2005 et Assous MV, CMI, 2009).
 - PCR en temps réel et sonde Taqman® ciblant une région conservée de l'ADNr 16S du genre *Borrelia* (Hovius, JR, 2013). Elle utilise une amorce sens et 2 amorces anti-sens, *Borrelia persica* n'étant pas détectée par la première amorce anti-sens. Un séquençage du produit amplifié est ensuite réalisé pour identification de l'espèce. Cette PCR détecte la nouvelle espèce de *Borrelia miyamotoi*

Techniques de recherche directe des *Borrelia*, agents de la borréliose de Lyme :

Culture

- Culture en milieu liquide BSK-H à partir d'échantillons biologiques humains ou de tiques.
- Culture en milieu BSK-H modifié, optimisé pour la culture de *B. afzelii* et *B. garinii*.
- Mise en place prochaine d'une culture en milieu liquide MKP modifié pour *B. miyamotoi* (partenariat avec JW. Hovius, Université d'Amsterdam).
- Culture de souches sur milieu solide, méthode mise au point par le laboratoire (but : production de souches clonales).

Amplification génique *in vitro*

- Plusieurs PCR en temps réel et sondes TaqMan® sur prélèvements biologiques humains ou de tiques pour la détection de l'ensemble des espèces connues en 2016 de *Borrelia*. Deux cibles sont disponibles en temps réel : gène chromosomique de la flagelline et gène *hbb*.
- PCR en temps réel et sonde TaqMan sur prélèvements biologiques pour recherche d'*Anaplasma phagocytophilum*, un pathogène co-transmis par *I. ricinus*, (cible : gène *msp2* codant la protéine de surface p44).
- Développement à venir d'une PCR pour *Candidatus Neohrlichia mikurensis*.
- PCR universelle sur le gène de l'ADNr 16 pour rechercher d'autres pathogènes transmis par les tiques.

Techniques de recherche indirecte de *Borrelia burgdorferi* sensu lato :

- Sérologie ELISA IgG et IgM séparés (Enzygnost VlsE Siemens®) validée au sein du CNR pour la réalisation de sérologie sanguine, de sérologie sur LCR et pour la recherche d'une synthèse intrathécale spécifique anti *B. burgdorferi* sensu lato. L'accréditation du paramètre sera officiellement notifiée en 2017.
- Sérologie de confirmation par techniques d'immuno-empreinte « maison » et commerciale sur sérum et/ou LCR des résultats positifs ou douteux lors du dépistage, pour étude des anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato. La calibration de ces tests a été réalisée à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux (don gracieux du Dr B. Crowe, Baxter).

Ces techniques de PCR, de culture et de sérologie sont utilisées dans le cadre de l'activité propre du laboratoire associé au CNR ainsi que pour la réalisation de projets de recherche clinique : un PHRC inter-régional « DIABOLYC » et le projet de recherche « biopsies cutanées » financé partiellement sur bourse de la SFD.

Techniques d'étude de *Borrelia* et *Borrelia* *in vivo* :

(Réalisées au sein d'une animalerie infectieuse agréée)

- Inoculation à l'animal (souris C3H et rats Lewis) sensibles à l'infection par différentes espèces de *Borrelia*.
- Inoculation à l'animal (souris BalB/C) sensibles à l'infection par *Borrelia crocidurae*
- Développement d'une lignée de tiques *Ixodes ricinus* infectées par différentes souches de *Borrelia*.
- Développement d'une lignée de tiques *Ornithodoros* pour étude des *Borrelia* agents de fièvre récurrentes.

1.4.2. Liste des techniques disponibles pour le typage

- Typage direct sur prélèvements ou sur culture par sondes fluorescentes spécifiques des principales espèces des différentes espèces de *Borrelia* et de *Borrelia* : 11 sondes actuellement disponibles pour identifier *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii* et *B. lusitaniae* ainsi que pour *B. andersonii*, *B. bissetii*, *B. japonica*, *B. tanuki*, *B. turdi*
- Typage direct sur prélèvements ou sur culture par PCR puis séquençage pour les résultats atypiques obtenus avec la méthode précédente
- Développement à venir de nouvelles sondes (pour *Borrelia miyamotoi*, *B. mayonii* par exemple)

1.4.3. Collections de souches, immun-sérums disponibles

Nous possédons une collection de sérums et de LCR, composée de :

- 145 sérums et 49 LCR de patients atteints des différentes formes cutanées, articulaires et neurologiques de la borréliose de Lyme, diagnostiquées selon les critères européens de l'EUCALB
- 149 sérums et 10 LCR de différentes réactions croisées avec la sérologie *Borrelia*
- collections de sérums de patients piqués par des tiques
- de 2500 sérums de la Mutualité Sociale Agricole dans le cadre d'un partenariat

La présence d'anticorps spécifiques dans ces sérums et LCR a été confirmée par western-blot IgG et/ou IgM. Les sérums et LCR sont stockés en aliquotes de 0,5 ml à -30°C.

Au cours des années du mandat précédent, cette collection a été régulièrement utilisée et renouvelée pour des études de performance de coffrets de sérologie.

Collection d'immun-sérums et de LCR :

Formes cliniques	Sérums	LCR
EM	40	/
NB	63	49
ACA	12	/
LCB	10	/
ART	20	/
Sérums pour l'étude des réactions croisées	149	10
Sérums précoces et tardifs de pathologies après piquûre de tiques	2 x 130	
Sérums de travailleurs forestiers (partenariat MSA)	2500	
Sérums de donneurs de sang	200	

Nous disposons fin 2015 d'une **collection de 123 souches humaines** de 6 espèces pathogènes de *Borrelia* (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. bissettiae*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis*).

Parmi celles-ci, **64 souches sont à très faible nombre de passages in vitro, car isolées au CNR à Strasbourg**, gage de leur virulence originelle confirmée, pour certaines sur modèle murin. Ces 64 souches sont les suivantes :

- 8 souches de *B. burgdorferi* isolées d'EM, dont 1 souche isolée d'EM multiple d'un patient ayant séjourné aux USA
- 13 souches de *B. garinii* isolées d'EM (11 souches), de lymphocytome cutané bénin (1 souche) et de LCS d'un patient atteint de neuroborréliose (1 souche)

- 43 souches de *B. afzelii* isolées d'EM (33 souches), de lésions d'EMM (2 souches d'un même patient), de lymphocytome cutané bénin (3 souches), d'acrodermatite chronique atrophiante (4 souches), de myosite (1 souche)

Par ailleurs :

- 59 autres souches humaines, nous ont été fournies par des collègues européens ou américains. Elles ont été isolées d'EM, de lymphocytome borrélien, d'arthrite, d'ACA et de LCS de patients atteints de neuroborréliose. Après accord du détenteur initial, ces souches peuvent être fournies par notre intermédiaire.
- Nous détenons également 12 souches à bas passage in vitro isolées de tiques, provenant de 8 espèces de *Borrelia* différentes : *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. bissettiae*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. spielmanii*. Ces souches ont été isolées par des collègues européens et américains qui nous les ont gracieusement fournies.

Nous détenons également une souche de chacune des espèces suivantes de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes :

-  *B. duttonii*
-  *B. crocidurae*
-  *B. hermsii*

Toutes ces souches sont répertoriées avec leur provenance géographique, leur donateur (le cas échéant), leur nombre de passage en culture in vitro et stockées en aliquotes de 0,5 ml à -80°C. Elles sont disponibles dans le cadre d'études collaboratives. Après accord du détenteur initial, ces souches peuvent être fournies par notre intermédiaire.

1.4.4. Bases de données de séquences

Nous disposons d'une base de données Maldi-TOF (Biotyper, Bruker) pour 79 souches de *Borrelia*.

2. ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES

Bilan des quatre premières années du mandat actuel (2012-2015)

Le CNR *Borrelia* a effectué ses différentes missions durant son mandat actuel avec les moyens humains suivants :

- * 0,4 ETP Biologiste médical
- * 0,5 ETP Entomologiste médical
- * 1 ETP Ingénieure
- * 1,3 ETP Technicienne

2.1 Les activités au titre de l'expertise microbiologique

2.1.1. Techniques développées ou en développement durant la mandature

2.1.1.1. Mise au point d'une PCR en temps réel pour le diagnostic de fièvres récurrentes

Le diagnostic biologique direct des borrélioses de fièvres récurrentes est classiquement réalisé sur sang total et LCR par frottis sanguin coloré au May Grünwald Giemsa. Afin d'augmenter la sensibilité de cette recherche, le CNR des *Borrelia* a développé durant la mandature deux méthodes PCR pour les *Borrelia* agents de fièvres récurrentes :

- une méthode PCR classique, après extraction de l'ADN (colonnes Qiagen®) avec 40 cycles d'amplification, puis révélation des amplicons éventuels sur gel d'agarose suivi, en cas de positivité, d'un séquençage des amplicons pour identification de l'espèce. Cette méthode cible une séquence d'ADN de 476 paires de bases d'une région de l'espace intergénique 16S-23S ADN_r, encadrée par deux amorces de 22 nucléotides.
- en 2013, après la description en Europe d'un cas humain de méningoencéphalite liée à une nouvelle espèce de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes, *Borrelia miyamotoi*, nous avons mis au point une méthode PCR en temps réel pour ces *Borrelia* afin de pouvoir aussi rechercher ces pathogènes dans des quantités importantes de tiques. Cette méthode moléculaire en temps réel repose sur la méthode publiée de J. Hovius (Hovius JWR, et al. Lancet 2013, 382 : 658). La cible est une séquence de 254 bases d'ADN du gène ADN_r 16S. Dans chaque série, sont intégrés un témoin négatif et un témoin positif (ADN de *B. hermsii* à 100fg/μL) d'amplification.

Le spectre de détection a été validé sur des ADN de souches de *Borrelia* de fièvres récurrentes *B. miyamotoi* (souches du Japon et de l'Université de Yale), *B. anserina*, *B. hermsii*, *B. crocidurae*, *B. duttoni*, *B. recurrentis*, *B. parkeri*, *B. turicatae*, *B. coriaceae*, *B. persica*, *B. hispanica*. La spécificité a été validée sur des souches de *Borrelia* : *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. bavariensis*, *B. spielmanii* et *B. valaisiana*.

La sensibilité de la technique est de 10 fg/μl d'ADN présent dans la prise d'essai pour toutes les espèces de *Borrelia* testées. Lorsque l'amplification est positive, 20μL d'amplifiat à 10 pg/μL sont séquencés.

2.1.1.2. Mise au point d'une technique de PCR en temps réel pour la détection de *Borrelia* dans les tiques

Au début de la mandature, nous avons mis au point une méthode de détection de *Borrelia* au sein des tiques.

Nous avons choisi, pour détecter la présence de *Borrelia*, d'amplifier le gène *fla B* (gène codant une protéine majeure du flagelle) par technologie de PCR en temps réel, *fla B* étant une cible commune à toutes les espèces de *Borrelia*.

La méthode de détection choisie a été une méthode de PCR en temps réel avec sonde TaqMan sur ABI 7500.

Nous avons tout d'abord procédé à l'optimisation des paramètres de PCR. Ainsi, les paramètres de températures, nombre de cycles, volume d'échantillon et concentrations en amorces ont fait

l'objet de tests. Nous avons notamment opté pour 45 cycles d'amplification, car ceci nous permet de discriminer au mieux les échantillons positifs tardivement, des négatifs.

2.1.1.3. Mise au point d'une technique d'identification des souches de *Borrelia* par spectrométrie de masse

L'identification des souches de *Borrelia* repose habituellement sur des méthodes moléculaires. L'identification par spectrométrie de masse repose pour les bactéries, sur la caractérisation de certains constituants de ses protéines ribosomiques. Une petite colonie bactérienne suffit en général comme quantité de matériel en nombre de bactéries nécessaires.

Borrelia ne se cultivant qu'en milieu liquide et avec un faible rendement, nous avons validé un protocole de préparation de ces bactéries pour analyse sur Maldi-TOF.

La base de données fournie par le fabricant du Maldi-TOF disponible au laboratoire (Bruker) contient actuellement près de 3500 entrées dont quelques unes seulement correspondent à des *Borrelia*.

Nous avons réalisé ≥ 20 dépôts pour la souche type de chaque espèce afin d'obtenir un bon spectre moyen de référence.

Nous avons actuellement testé :

- 24 souches de *B. afzelii* : 100% de corrélation observée
- 30 souches de *B. burgdorferi* : 100 % de corrélation observée
- 22 souches de *B. garinii* : 100 % de corrélation observée
- 3 souches de *B. bavariensis* : 100 % de corrélation observée.

Pour valider la méthode, il nous reste à tester plus de souches de *B. bavariensis* ainsi que des souches *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. bissetii*, *B. andersonii*, *B. turdae*, *B. lusitaniae*, *B. japonica*, des espèces nouvellement décrites et des espèces responsables de fièvres récurrentes.

2.1.1.4. Technique en développement : identification des espèces de tiques par spectrométrie de masse (Maldi-TOF)

Une banque de données de tiques du genre *Ixodes* a été initiée en spectrométrie de masse en collaboration avec le Dr L. Almeras de l'URMITE-CNRS de Marseille. Cette banque va être étoffée avec différentes espèces d'*Ixodes* mais également avec d'autres genres de tiques.

2.1.2. Travaux d'évaluation de trousse commerciale

2.1.2.1. Evaluation d'une méthode commercialisée de typage moléculaire (Light Cycler, Roche®)

L'étude a porté sur 16 échantillons. Les ADN testés étaient extraits de 5 biopsies de peau et de 11 liquides articulaires.

Le pourcentage global de concordance des résultats de détection et de typage moléculaire par la trousse commerciale et par la méthode de typage du CNR *Borrelia* était de 43,7% seulement avec 20% de concordance sur les biopsies cutanées et 54,5% de concordance sur liquides articulaires.

Les typages moléculaires d'espèces obtenus par la trousse commerciale concordent avec ceux obtenus par la méthode de typage moléculaire du CNR dans 60% des cas pour *B. afzelii* (3/5), 50% des cas pour *B. burgdorferi* sensu stricto (3/6) et 0% des cas pour *B. garinii* (0/3).

Parmi les biopsies cutanées testées (n = 5), le typage moléculaire par la trousse commerciale a détecté une majorité de *B. garinii* (3/5), 1 *B. afzelii* et 1 *B. burgdorferi*, alors que le CNR les a toutes identifiés *B. afzelii*.

Parmi les liquides articulaires testés (n = 11), le typage moléculaire par la trousse commerciale a détecté une majorité de *B. burgdorferi* sensu stricto (5/11) et de *B. afzelii* (4/11), 1 était non typable et 1 prélèvement était négatif. Le CNR a confirmé la négativité de ce dernier et a identifié *B. afzelii* dans le liquide articulaire non typable par la trousse commerciale.

Concernant les échantillons typés par le kit commercial comme étant des *B. burgdorferi* sensu stricto, nous avons confirmé cette identification dans 60% des cas (3/5), les 2 autres étant en fait des *B. afzelii*.

Parmi les échantillons typés par le kit commercial comme étant des *B. afzelii*, nous avons confirmé cette identification dans 50% des cas (2/4), les 2 autres étant en fait des *B. garinii*.

Au total, nous avons observé des discordances avec la technique du CNR, que ce soit dans les biopsies cutanées ou les liquides articulaires. Le fabricant sera contacté durant la prochaine mandature pour participer à une étude comparative avec d'autres trousse commerciale.

2.1.2.2. Evaluation de deux tests ELISA Borreliella : Liaison IgG et IgM Diasorin® et Enzygnost Lyme IgG et IgM Siemens®

Le but de l'étude était de comparer les performances de ces deux trousse sur 62 échantillons pour les IgG et 60 échantillons pour les IgM. Les seuils d'interprétation des trousse testées étaient ceux des fabricants.

Le CNR *Borrelia* a expertisé les échantillons présentant des résultats discordants.

Pour les échantillons analysés avec les deux coffrets, les résultats étaient les suivants :

	IgG	Liaison XL			
Enzygnost		Positif	Douteux	Négatif	Total
	Positif	32	0	0	32
	Douteux	1***	0	5	6
	Négatif	3*	1	20	24
	Total	36	1	25	62

	IgM	Liaison XL			
Enzygnost		Positif	Douteux	Négatif	Total
	Positif	13	0	17	30
	Douteux	0	0	0	0
	Négatif	3**	0	27	30
	Total	16	0	44	60

Le nombre de résultats discordants s'élève à 10/62 (16,1%) en IgG et à 30/60 (50%) en IgM.

Les échantillons discordants analysés par les deux trousse ont été expertisés au CNR par ELISA Enzygnost® Siemens et western-blot « maison » du CNR. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Nbre d'échantillons à expertiser (n = 30)	Enzygnost® Triturus	Diasorin® Liaison XL	Expertise CNR Borrelia
3	IgM-	IgM+	1 IgM+ et 2 IgM-
3	IgG-	IgG+	1 IgG+ et 2 IgG-
1	IgGdtx	IgG+	1 IgG+
2	IgM+	IgM+	2 IgM+
8	IgM+/IgG-	IgM-	6 IgM+ et 2 IgM-
3	IgM+/IgG+	IgM-	1 IgM+/2 IgG+
10	IgG+	IgG+	10 IgG+

Les résultats du CNR montrent que les 12 sérums concordants par les deux techniques (2 en IgM et 10 en IgG) sont concordants avec les résultats du CNR.

Globalement pour la détection des IgG et IgM confondu : les deux méthodes ont le même taux de faux positifs en ELISA qui s'élève à 13%, la technique Diasorin® sur Liaison XL présente un taux de faux négatifs à 23% essentiellement en IgM. Ce taux est près de deux fois plus élevé que celui de la technique Enzygnost® qui est à 10%.

2.1.2.3. Evaluation de trousse d'immuno-empreinte (western-blot) pour confirmation de la sérologie *Borrelia* (anciennement *B. burgdorferi sensu lato*)

Design de l'étude

Nous avons proposé aux fabricants et fournisseurs français d'évaluer leurs réactifs sérologiques de confirmation des infections à *Borrelia* par immuno-empreinte. Notre objectif est d'évaluer et de comparer les coffrets disponibles sur le marché français. Cette évaluation est importante car il s'agit de réactifs de confirmation.

Pour mener à bien cette étude, nous avons sollicité fin 2014 la participation de toutes les sociétés dont nous avons connaissance à cette date sur le marché français. Six des 7 fabricants présents ont répondu positivement et nous ont fourni gracieusement le matériel, l'informatique et les réactifs nécessaires.

Un fournisseur présent sur le marché français n'a pas souhaité participer à cette étude (produits MASTABLOT® *Borrelia burgdorferi* IgG et IgM). Ce fabricant n'est plus commercialisé en France.

Six trousse commerciales ont été ainsi évaluées en IgG et en IgM par le CNR *Borrelia* :

- les coffrets *Borrelia* Europe plus Tpn17 Line (IgG) et *Borrelia* Europe Line (IgM) (Sekisui Virotech /Ingen®)
- les coffrets Euroline RN-AT anti-*Borrelia* IgG et IgM (Euroimmun®)
- les coffrets Euroline WB anti-*Borrelia* IgG et IgM (Euroimmun®)
- les coffrets *Borrelia* Virastripe IgG et IgM (Viramed/Servibio®)
- les coffrets Recomline® IgG et IgM (Mikrogen®) ont au total été évalués deux fois car distribués en France par deux sociétés différentes, Biosynex® et DiaSorin®, sous deux noms différents : Lyme check (Biosynex®) et RecomLine IgG et IgM (DiaSorin®).

Une fois les problèmes organisationnels et logistiques résolus (automatisation partielle), nous avons réalisé les manipulations en 2015.

Nous avons évalué la sensibilité, la spécificité des trousse en utilisant les critères des fabricants. La praticabilité a aussi été évaluée durant les tests.

L'étude a été comparative sur les différents panels de sérums suivants :

Panel 1 : sérums de patients atteints d'érythème migrant typique diagnostiqués par des dermatologues ou des infectiologues et pour certains, confirmés par recherche directe de *Borrelia* (culture ou PCR)

Panel 2 : sérums de patients atteints de neuroborréliose évolutive selon les critères de l'EUCALB et ayant une sérologie positive dans le LCR confirmée par un index de synthèse intrathécale spécifique

Panel 3 : sérums de patients ayant une manifestation tardive de la borréliose de Lyme (arthrite ou acrodermatite) diagnostiqués par des dermatologues, des infectiologues ou des rhumatologues et pour certains, confirmés par recherche directe de *Borrelia* (culture et/ou PCR)

Panel 4 : sérums de donneurs de sang (Il s'agit de sérums de sujets citadins ne fréquentant pas les forêts. Les sérums prélevés ont été retenus sur la base de leur négativité par notre western-blot maison)

Panel 5 : sérums de patients atteints de maladies donnant potentiellement des réactions croisées (syphilis évolutive, mononucléose infectieuse, maladies auto-immunes)

Au total, cette étude a été réalisée sur :

- une centaine de sérums de donneurs de sang
- une centaine de sérums des différentes manifestations cliniques de la borréliose de Lyme : 30 EM, 30 NB, 30 ACA ou arthrite de Lyme
- une centaine de sérums donnant des réactions croisées : 30 syphilis, 30 MNI, 30 AAN.

Analyse des performances des trousse en IgG et IgM

Les critères d'interprétation des résultats des trousse testées étaient ceux des fabricants.

Pour l'analyse des résultats de cette étude, les résultats douteux ont été considérés comme des négatifs pour les calculs de spécificité et comme positifs pour les calculs de sensibilité.

Dans l'étude de spécificité, les échantillons détectés positifs avec au moins 3 trousse n'ont pas été pris en compte pour l'analyse.

Les trousse IgG testées sur les donneurs de sang, montrent une spécificité variant de 94,2 % à 100 %, satisfaisant pratiquement pour tous les coffrets les recommandations EUCALB.

Des différences entre coffrets apparaissent sur les panels de sérums de réactions croisées. Les valeurs varient de 84,3 % à 100 %.

L'analyse du panel des sérums de neuroborrélioses montre des résultats hétérogènes entre les coffrets.

Une étude ultérieure des critères d'interprétation des fabricants sera réalisée afin de déterminer les causes de ces différences.

L'analyse des sérums des autres panels de patients montre en IgG :

- une mauvaise sensibilité des coffrets pour les érythèmes migrants (EM), ainsi que rapporté dans la littérature, tant en ELISA qu'en western-blot

- une très bonne sensibilité pour le panel des sérums d'arthrites de Lyme et d'acrodermatites atrophiantes (ACA) avec une sensibilité allant de 93,3 à 100. Cette fourchette de valeurs est celle rapportée habituellement dans la littérature.

Les trousses IgM testées sur les donneurs de sang, montrent une spécificité variant de 96 % à 100 %, satisfaisant pratiquement pour tous les coffrets les recommandations EUCALB.

Des différences entre coffrets ont été observées sur le panel de sérums de réactions croisées. Les valeurs varient de 90,8 % à 100 %.

L'étude de la sensibilité IgM révèle des différences entre les trousses que ce soit vis à vis des panels de sérums d'EM ou de neuroborrélioses.

Une plus grande hétérogénéité avec parfois des sensibilités très faibles est observée vis à vis des panels de sérums de population d'arthrite-ACA.

Il est à noter que les IgM n'ont pas de réel intérêt clinique dans le cadre du diagnostic des formes tardives de borréliose. Ces faibles sensibilités en IgM ne sont donc pas un argument réellement important pour le choix ou non de ces trousses, à la différence des trousses IgG. L'intérêt clinique global d'un test western-blot IgM peut être rediscuté.

Les résultats individuels de cette évaluation seront discutés avec chaque fournisseur puis analysés statistiquement et publiés sur le site internet du CNR ainsi que dans un prochain rapport.

Analyse de la praticabilité des différents coffrets

La praticabilité des différentes trousses a parallèlement fait l'objet d'une évaluation par le CNR.

Les différents items détaillés dans le tableau ci-dessous (Tableau : Praticabilité des trousses) découlent de l'utilisation de ces trousses en parallèle lors de l'évaluation des performances analytiques des réactifs.

Si toutes les bandes réactives possèdent bien un contrôle de réaction, deux ne possèdent pas de marqueur de « cut-off » sur chaque bandelette. Ce marqueur est alors sur une bande réactive à part, ce qui peut poser des problèmes si cette bande contrôle subit un problème technique, toute la série étant alors rejetée.

Concernant l'utilisation des bandelettes, celle-ci doit être précautionneuse, certaines se sont avérées plus cassantes que d'autres et donc délicates à manipuler. Cet écueil peut être pallié par une automatisation complète disponible pour certaines trousses.

Dans l'étude de sensibilité des coffrets, sur les populations de neuroborréliose et d'EM, certains coffrets présentaient un pourcentage important de tests douteux qui ont été catégorisés comme expliqué en préambule comme des positifs. Cela pourrait témoigner d'un manque de sensibilité de ces coffrets sur des manifestations récentes de maladie de Lyme.

Certaines trousses se sont révélées plus sujettes à réagir de façon non spécifique avec certains échantillons (bandelettes invalides), rendant alors impossible l'obtention d'un résultat interprétable.

Enfin, la facilité de l'utilisation du scanner fourni par le fabricant est apparue variable d'une trousse à l'autre. Dans ce critère, ont été jugés à la fois la qualité de la lecture numérique et donc de l'interprétation du signal et la conservation pour exploitation ultérieure des données analytiques.

Tableau 1 : Praticabilité des trouses testées

	1	2	3	4	5	6
Présence des contrôles de réaction	X	X	X	X	X	X
Présence du cut-off sur chaque bandelette	X	X	X	X		X
Présence des témoins positifs et négatifs dans le coffret	X	X			X (IgG)	
Fragilité des bandelettes à la manipulation (croît de 1 à 5)	5	5	2	2	4	3
Semi-automatisation	X	X	X	X	X	X
Possibilité actuelle d'automatisation complète	X	X				
Facilité d'utilisation du scanner (croît de 1 à 5)	4	3	4	4	3	5
Problème de bandelettes invalides			X	X		X

1 : très insuffisant ; 2 : insuffisant ; 3 : acceptable ; 4 : bon ; 5 : très bon

2.1.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires au cours de la mandature

Ces transferts ont concerné les techniques diagnostiques spécifiques sérologiques et d'amplification génique :

- **2012** : Protocole de détermination de la synthèse intrathécale d'IgG spécifiques pour le diagnostic de neuroborréliose au CHU de Nancy
- **2013** : PCR spécifique pour la détermination de *Borrelia* sur biopsies tissulaires et LCR au CHU de Tours.

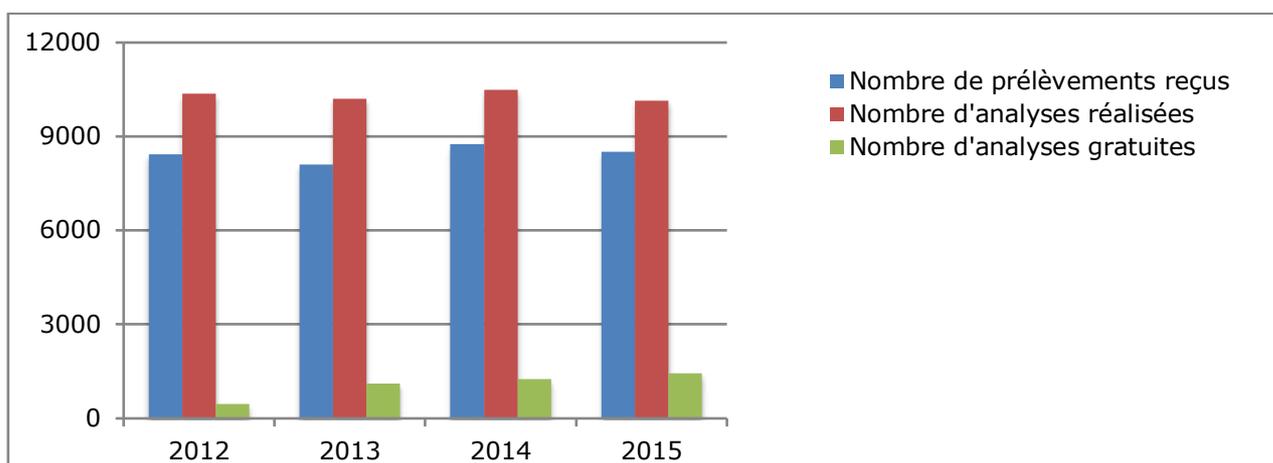
2.1.4. Expertise en sérologie de *Borrelia* (anciennement *B. burgdorferi* s.l) durant la mandature

En 2015, 8 518 échantillons biologiques ont été réceptionnés par le CNR *Borrelia* accompagnés de demandes de confirmation diagnostique de borréliose de Lyme principalement par sérologie, parfois par PCR ± culture. Sur l'ensemble de ces échantillons, le nombre d'analyses sérologiques (ELISA + western-blot + synthèse intra-thécale) réalisées s'élève à 10 143.

Environ 14 % de ces 10 143 analyses ont été réalisées à titre gratuit car elles étaient accompagnées d'une fiche de renseignements cliniques et épidémiologiques, soit 1 435 analyses réalisées sur 983 prélèvements.

Le recueil de ces fiches de renseignements entre dans le cadre de nos activités de surveillance des cas humains de borréliose de Lyme et est analysé plus loin. En l'absence de cette fiche, l'analyse a été réalisée et facturée par le CHU de Strasbourg.

Activité d'expertise sur les 4 années du CNR :



Cette activité a été globalement stable sur les 4 premières années de la mandature du CNR. Le nombre d'échantillons accompagnés d'une fiche de renseignements épidémiocliniques a légèrement progressé (cf. *Annexes*).

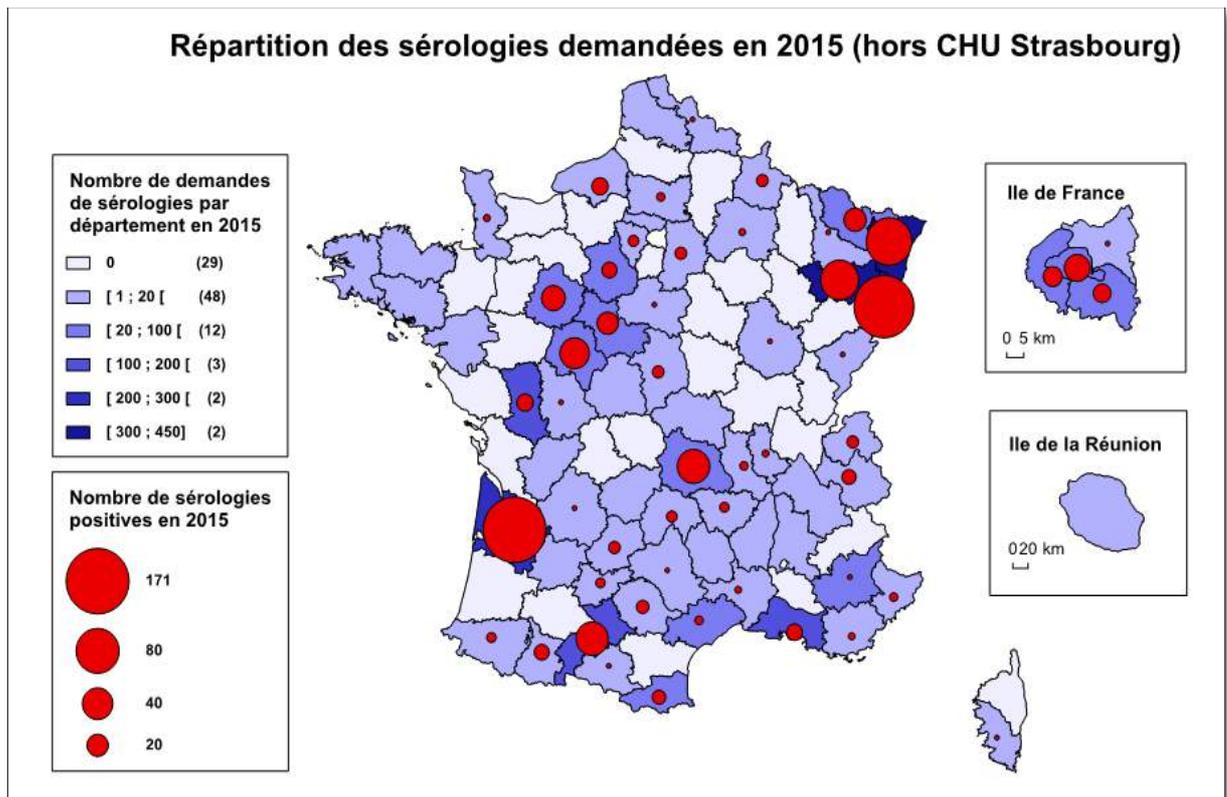
2.1.4.1. Sérologies de 1ère intention par ELISA

2.1.4.1.1. En 2015

Le CNR a réalisé 7 198 sérologies par ELISA sur 5 337 sérums et 1 861 sur LCS. Cette activité est globalement stable depuis le début du mandat du CNR. Ces échantillons provenaient de 65 départements répartis sur le territoire national dont un département d'outre-mer.

Origine géographique (hors CHU de Strasbourg) des résultats positifs pour les sérologies de dépistage adressées au CNR des *Borrelia* en 2015

En France, les demandes émanaient de 65 départements et représentaient 2 749 analyses, hors CHU de Strasbourg. La carte ci-dessous objective le nombre d'analyses adressées au CNR par département demandeur et le nombre d'analyses positives en sérologie de 1^{ère} intention par ELISA :



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

Ces 2749 demandes nationales (hors CHU de Strasbourg) concernaient :

- 1 912 sérums dont 644 (33,7 %) étaient positifs et 174 (9,1 %) étaient douteux
- 837 LCS dont 255 (30,5 %) étaient positifs

Au total, 1 073 prélèvements étaient positifs (32,7 %) ou douteux (6,3 %) en ELISA. La spécificité de ces résultats a été confirmée par immuno-empreinte, conformément aux recommandations nationales et européennes.

Demandes de sérologies de 1^{ère} intention par ELISA provenant d'Alsace en 2015

En Alsace, zone d'endémie de la borréliose de Lyme, les demandes en 2015 représentaient 4 896 analyses, soit environ 2 fois plus que les demandes nationales.

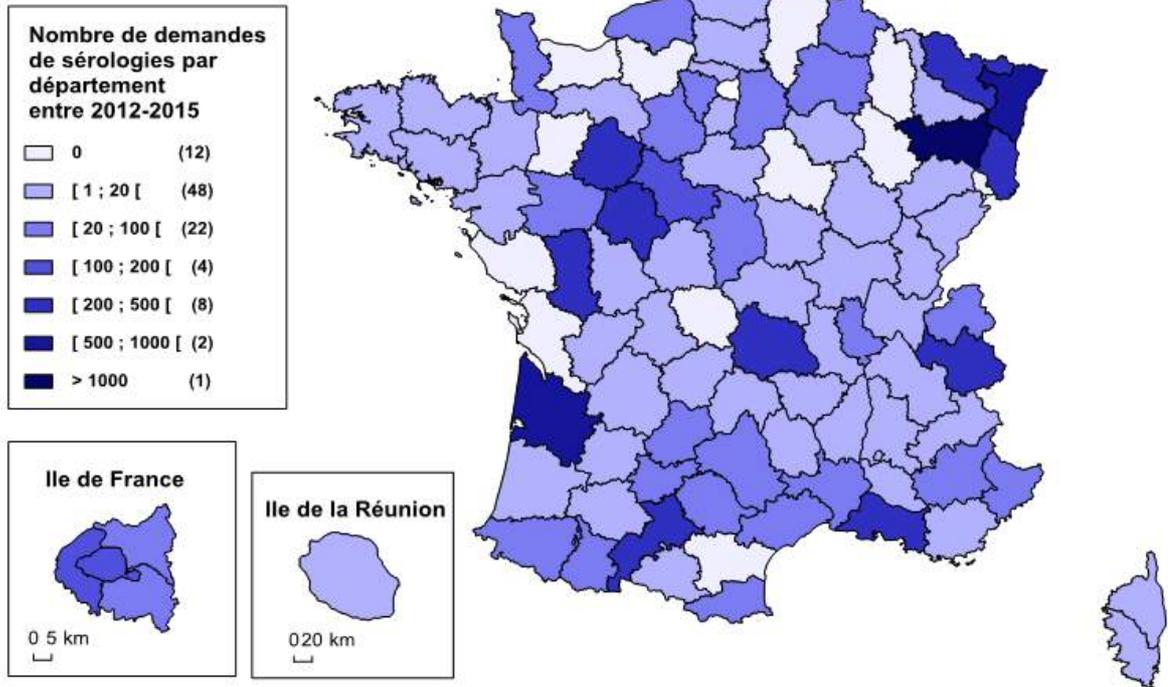
Parmi celles-ci, 447 (9,1 %) provenaient de CH ou de laboratoires privés et 4 449 du CHU de Strasbourg.

Les 447 demandes d'Alsace hors CHU étaient réparties de la façon suivante :

- 267 sérums dont 88 (33 %) positifs ou douteux
- 180 LCS dont 30 (16,7 %) positifs ou douteux

Sur ces 447 demandes hors CHU, 118 (26,4 %) étaient positives ou douteux en ELISA. La spécificité de ces résultats a été confirmée par immuno-empreinte.

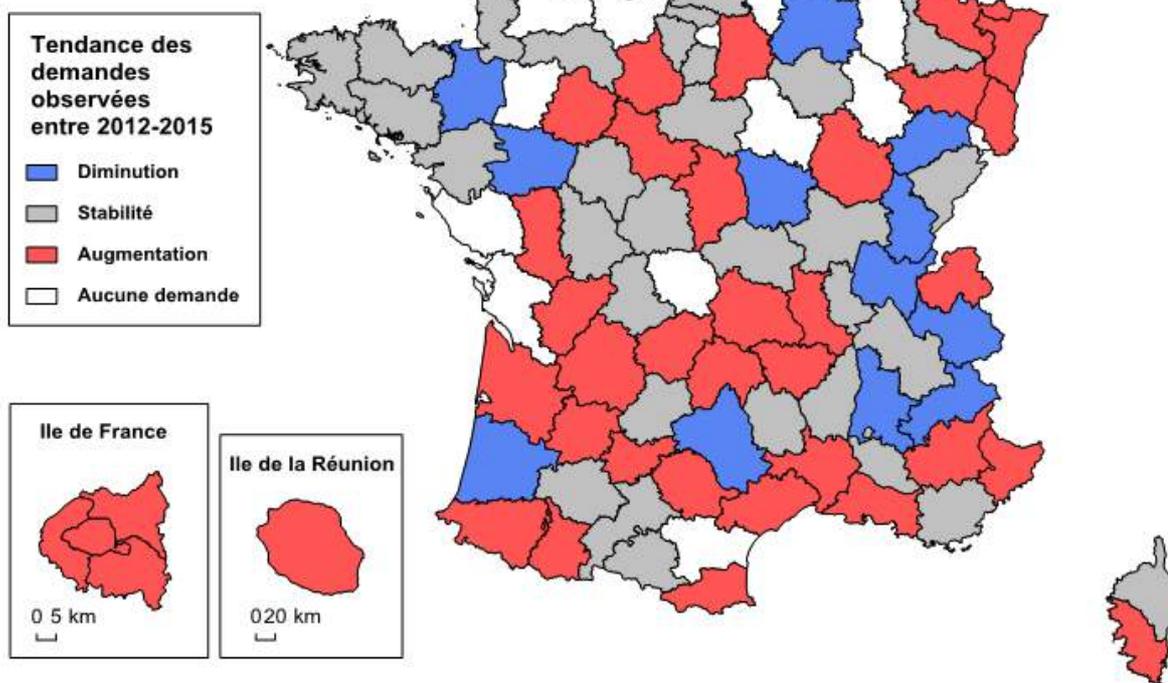
Répartition des sérologies demandées entre 2012-2015 (hors CHU Strasbourg)



Il existe une bonne couverture nationale du CNR avec 15 départements adressant plus de 100 sérums/an pour dépistage sérologique en ELISA, répartis dans les différentes grandes régions de France. Cette répartition permettrait de détecter une éventuelle augmentation inhabituelle du nombre de positifs dans une partie du territoire.

DONNÉES DU

Evolution des demandes de sérologies entre 2012-2015 (hors CHU Strasbourg)

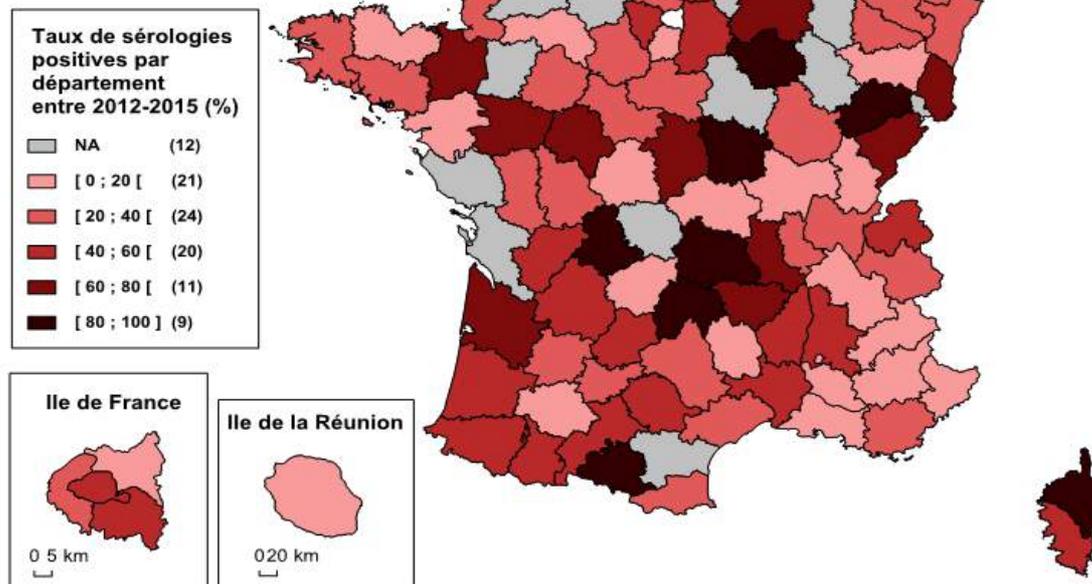


La répartition des demandes est globalement similaire sur les 4 années. On constate néanmoins une augmentation du nombre de demandes adressés au CNR pour 36 départements français et une diminution dans 13 départements.

DONNEES DUCI

Pour ces analyses ELISA réalisées, le pourcentage de positifs varie selon les départements français :

Taux de positivité des sérologies demandées entre 2012-2015 (hors CHU Strasbourg)



Cette carte de répartition du taux de positivité ne se superpose pas à la prévalence de *Borrelia* dans les tiques ni à celle de l'incidence nationale de la borréliose de Lyme (données du réseau Sentinelles).

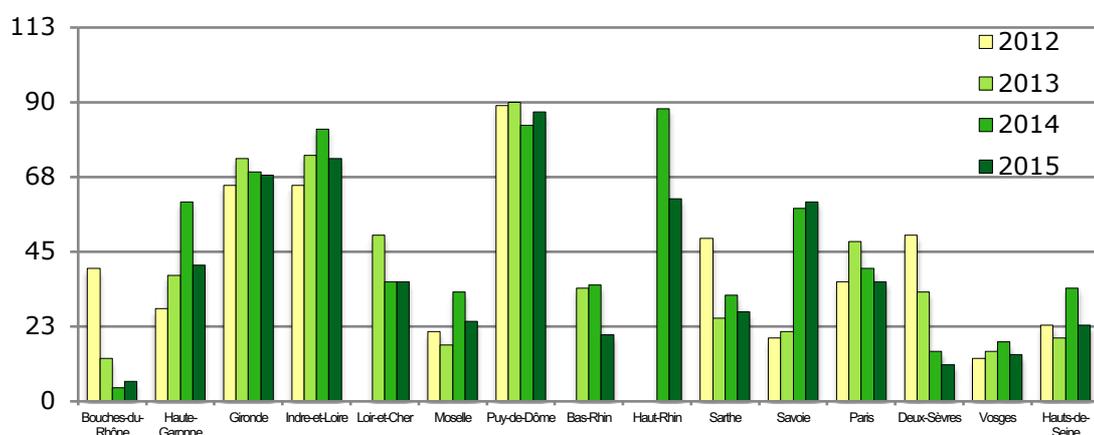
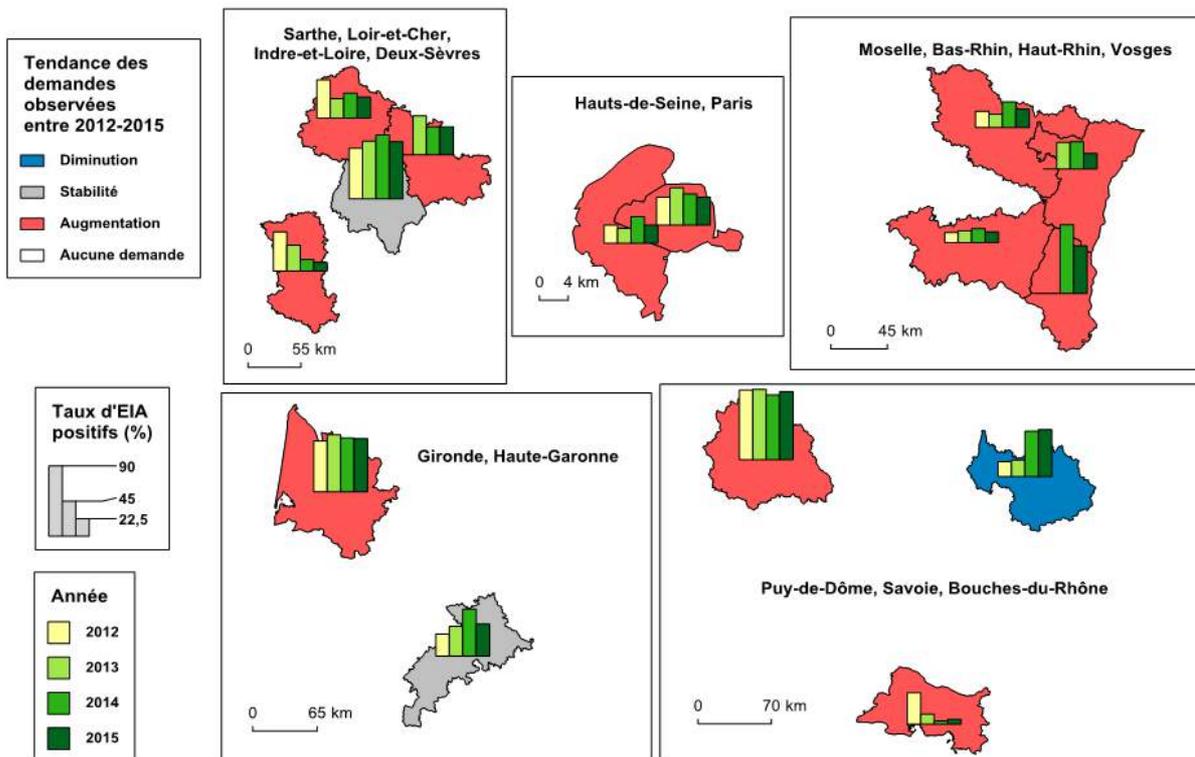
Ceci montre que les laboratoires publics ou privés ayant recours au CNR le font dans plusieurs contextes :

- sous-traitance régulière de leurs analyses *Borrelia* par ELISA, dans le cas de laboratoires à faible activité sur ce paramètre
- confirmation des sérologies positives réalisées chez eux (départements à taux de positivité de 40 à 100%)
- confirmation de la négativité des sérologies réalisées chez eux. Cette demande est en augmentation sous la pression de patients et parfois de médecins liée à la médiatisation de la borréliose de Lyme.

Cela s'illustre en Limousin par exemple, zone d'endémie pour la borréliose. Le pourcentage d'analyses positives réalisées par le CNR est > 60% en Haute-Vienne alors qu'il est < à 20% en Corrèze où l'incidence est similaire. On retrouve cette différence en Ariège (stabilité du nombre de demandes, taux de positif >80%) à l'inverse d'un département voisin, les Pyrénées-Atlantiques (nombre de demandes en augmentation, taux de positif faible)

Parmi les 15 départements mentionnés plus haut à nombre de demandes annuelles > 100 /an en 4 ans), 12 sont en augmentation. Nous avons analysé ces demandes et l'évolution du taux de sérologies positives sur les 4 ans :

Evolution des demandes des départements avec >100 demandes (hors CHU Strasbourg)



On constate que parmi les départements adressant au CNR un nombre de demandes croissant sur les 4 ans, deux montrent en parallèle une diminution du taux de positifs détectés : Deux-Sèvres, Bouches-du Rhone, illustrant probablement les demandes liées à la médiatisation croissante de la borréliose de Lyme.

2.1.4.2. Sérologies de confirmation par western-blot (immuno-empreinte ou WB)

2.1.4.2.1 En 2015

En 2015 ont été réalisées 2 628 sérologies de confirmation par immuno-empreinte. Cette activité est en nette augmentation de près de 66,5 % par rapport à 2014 (1 579 analyses réalisées).

Dans 18,3 % des cas, seul le WB était demandé sur des sérums déjà dépistés positifs en ELISA par les laboratoires demandeurs. Le but du WB étant de confirmer la spécificité des anticorps dépistés, il n'est pas systématiquement réalisé et certains laboratoires, notamment en faible zone d'endémie, préfèrent externaliser cette prestation.

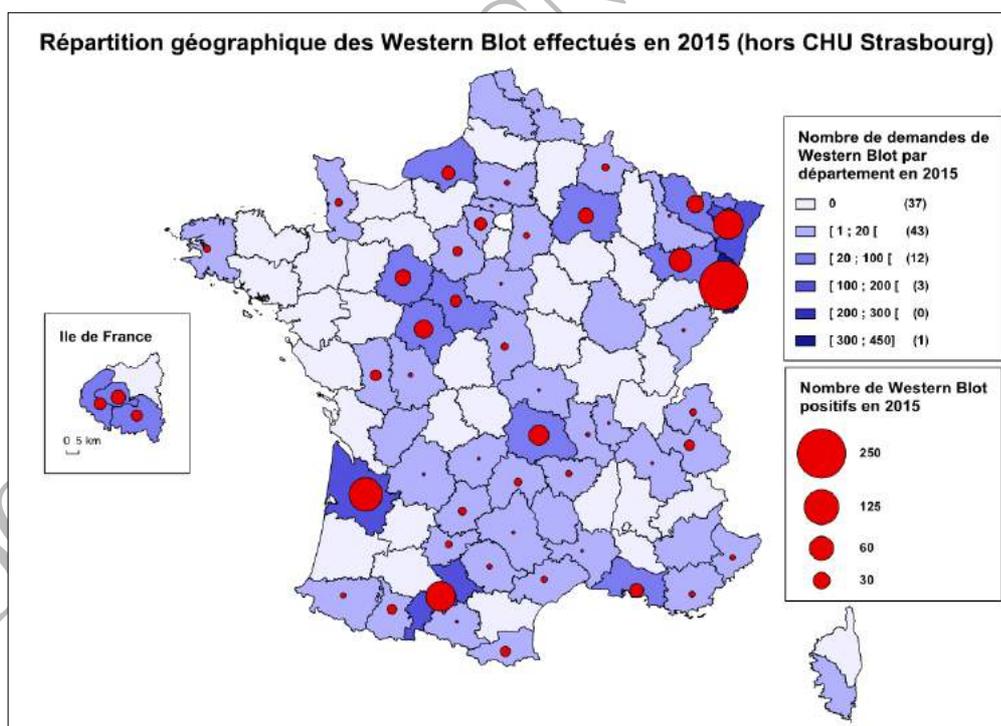
Ces confirmations en WB ont été réalisées sur 2 173 sérums et 455 LCS. Sur ces 2 628 analyses, 1829 étaient positives par WB, soit 69,6 %. Donc, près d'un tiers des échantillons initialement détectés positifs ou douteux en ELISA étaient de faux positifs. Ce taux élevé de réactions croisées en ELISA en routine objective l'importance de l'analyse de confirmation par WB avant de conclure à la positivité de la sérologie de Lyme.

Répartition des sérums testés en WB et des résultats positifs pour les sérologies de confirmation adressées au CNR des Borrelia en 2015 en France (hors région Alsace).

Les demandes de confirmation sérologique provenaient de 59 départements français répartis sur le territoire national, soit une stabilité par rapport à 2014 avec 56 départements demandeurs.

Les demandes, hors CHU de Strasbourg, représentaient 1 592 analyses. Sur la carte ci-dessous représentant le nombre de demandes par département et le nombre de WB positifs en sérologie de confirmation.

Les départements en bleu clair ne nous ont adressé aucune demande. En Alsace, les demandes du CHU de Strasbourg ont été exclues volontairement car elles sont analysées par la suite dans un paragraphe dédié.



Ces demandes nationales (hors CHU) concernaient :

- 1258 sérums dont 772 (61,4 %) positifs
- 334 LCS dont 253 (75,7%) positifs.

En moyenne, la spécificité des anticorps a été confirmée par WB pour 64,4 % des prélèvements initialement dépistés positifs ou douteux en ELISA. Sur l'ensemble de ces demandes, 477 prélèvements, soit 29,9 %, ont été adressés uniquement pour confirmation par WB. Parmi ces 477 demandes, 349 (73,2 %) étaient positives.

La similitude des pourcentages de confirmation par WB dans les différents départements peut correspondre à une amélioration de la standardisation de la spécificité des trousse ELISA utilisées sur l'ensemble du territoire.

Répartition des sérums testés en WB en Alsace et des résultats positifs pour les sérologies de confirmation adressées CNR des Borrelia en 2015

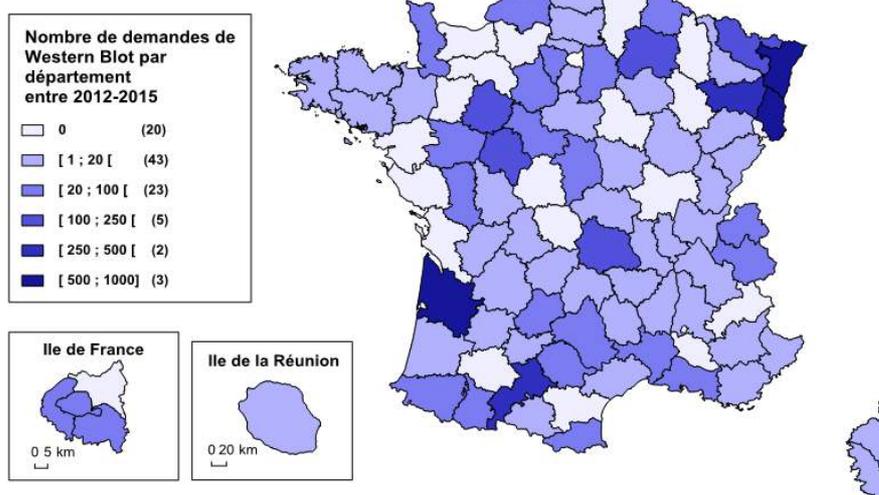
Cette année, 1 582 western-blot réalisés par notre laboratoire ont été prescrits en Alsace. Parmi ces analyses, 1 110 (70,2 %) étaient positives. Selon la nature du prélèvement, les demandes étaient réparties de la manière suivante :

- 1 383 sérums dont 972 (70,3 %) positifs
- 199 LCS dont 138 (69,3 %) positifs

Les demandes du CHU de Strasbourg étaient majoritaires, elles représentaient 1036 analyses (65,5 %). Les demandes hors CHU ont généré 546 analyses (34,5 %). La spécificité des anticorps a été confirmée par WB pour 65,5 % des prélèvements initialement dépistés positifs ou douteux en ELISA, soit une valeur identique à la moyenne des autres départements français.

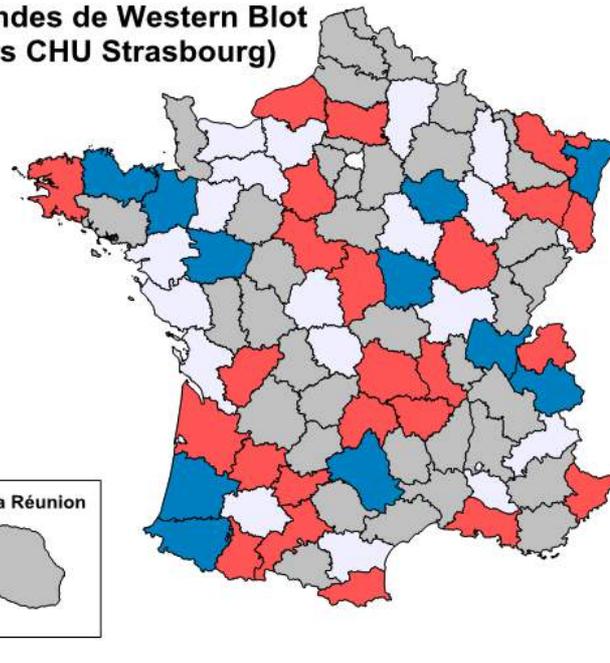
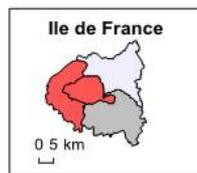
2.1.4.2.2 Bilan sur 4 années de mandature du CNR Borrelia

Répartition des Western Blot effectués entre 2012-2015 (hors CHU Strasbourg)

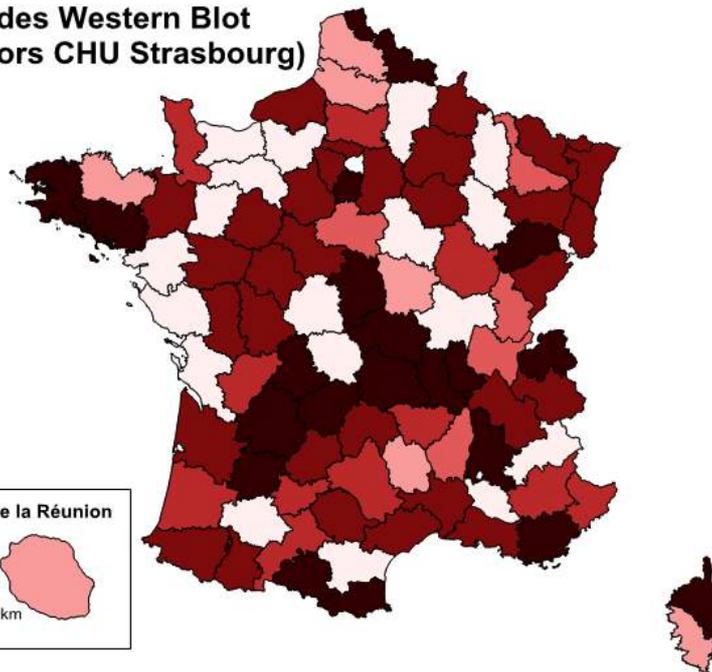
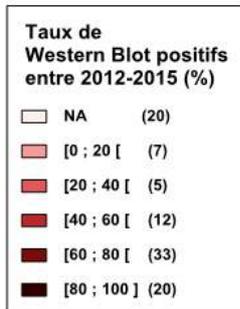


Il existe une bonne couverture nationale de l'activité de confirmation par WB du CNR, avec seulement 19 départements non demandeur.

Evolution des demandes de Western Blot entre 2012-2015 (hors CHU Strasbourg)



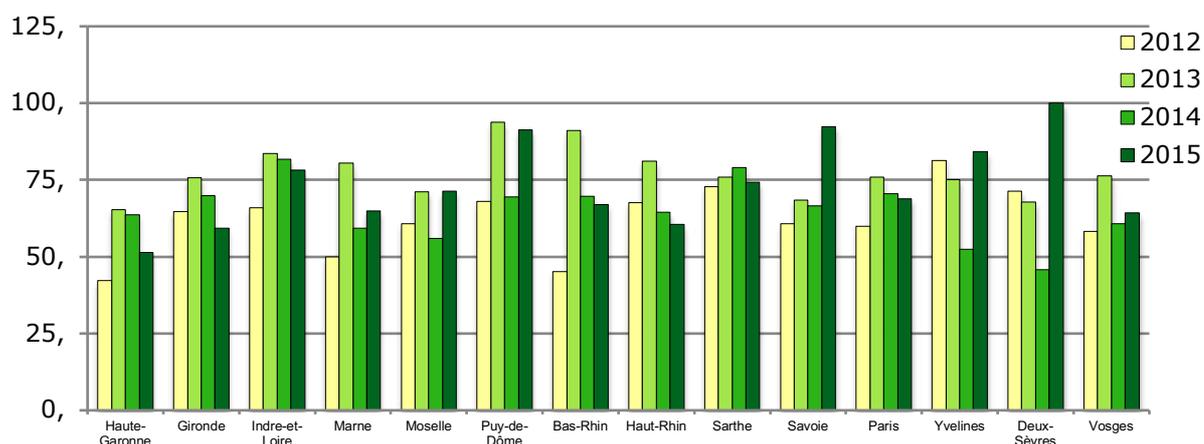
Taux de positivité des Western Blot entre 2012-2015 (hors CHU Strasbourg)



De même que la carte des sérologies de 1^{ère} intention par ELISA, cette carte de répartition du taux de positivité en western-blot ne se superpose ni à la prévalence de *Borrelia* dans les tiques ni à celle de l'incidence nationale de la borréliose de Lyme.

On retrouve la même tendance, avec :

- des départements à fort taux de positivité en western-blot (60 à 100%). Cela correspond probablement à des laboratoires ayant recours au CNR, pour confirmer des sérologies positives ou douteuses par ELISA, comme prévu par la NABM,
- quelques départements à faible taux de positivité (<20%). Ceci correspond probablement à des laboratoires nous adressant les sérums « *tout venant* » ou négatifs, pour lesquels ils souhaitent confirmer la négativité.



Sur les 4 années, environ 70 % des demandes étaient positives en moyenne. Ce pourcentage est assez stable d'une année à l'autre sauf en Savoie et Deux-Sèvres où l'augmentation de ce pourcentage observée en 2015 semble indiquer une meilleure utilisation des tests dans leur indication et/ou l'utilisation de tests ELISA de 1^{ère} intention plus spécifiques.

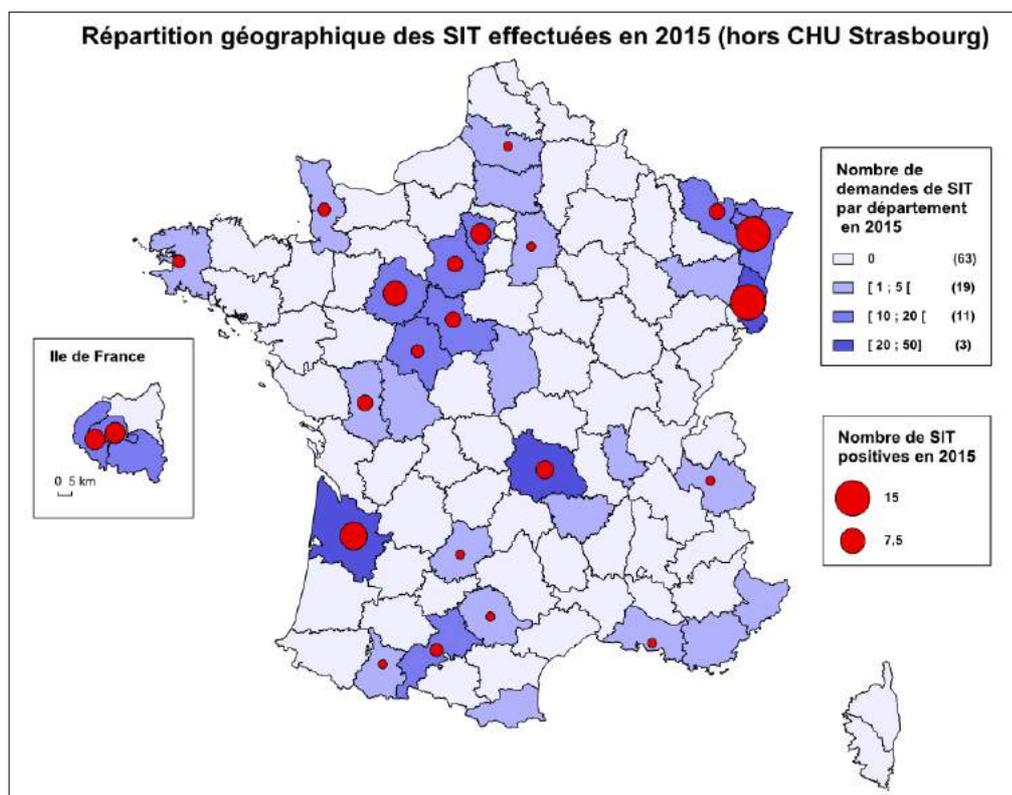
2.1.4.3. Etude de la synthèse intrathécale spécifique anti Borreliella

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

Dans le cadre de nos conseils aux professionnels de santé, nous avons continué en 2015, à diffuser auprès des cliniciens et des biologistes, l'intérêt de cet outil pour le diagnostic des neuroborrélioses et à expliquer aux collègues biologistes libéraux ou hospitaliers le protocole pratique pour réaliser l'analyse.

2.1.4.3.1. En 2015

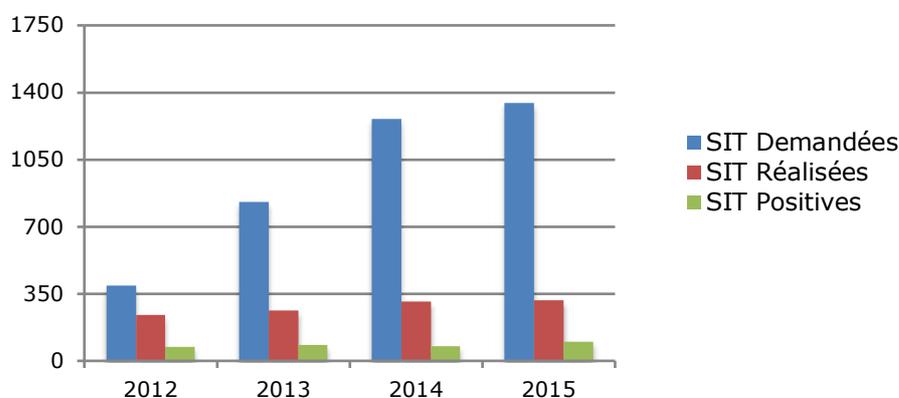
L'ensemble des demandes de synthèse intrathécale s'élevait à 1346, dont 1029 (76,5 %) n'ont pas été réalisées en raison de sérologie négative dans le sérum et/ou le LCS. Dans ce cas, la recherche de SIT n'est pas indiquée.



En 2015, 98 analyses étaient positives, soit 30,9 %, permettant d'affirmer dans ce cas le diagnostic de neuroborréliose. Dans 3,8 % des cas, le résultat de la SIT était douteux et ne permettait ni d'affirmer ni d'infirmer le diagnostic.

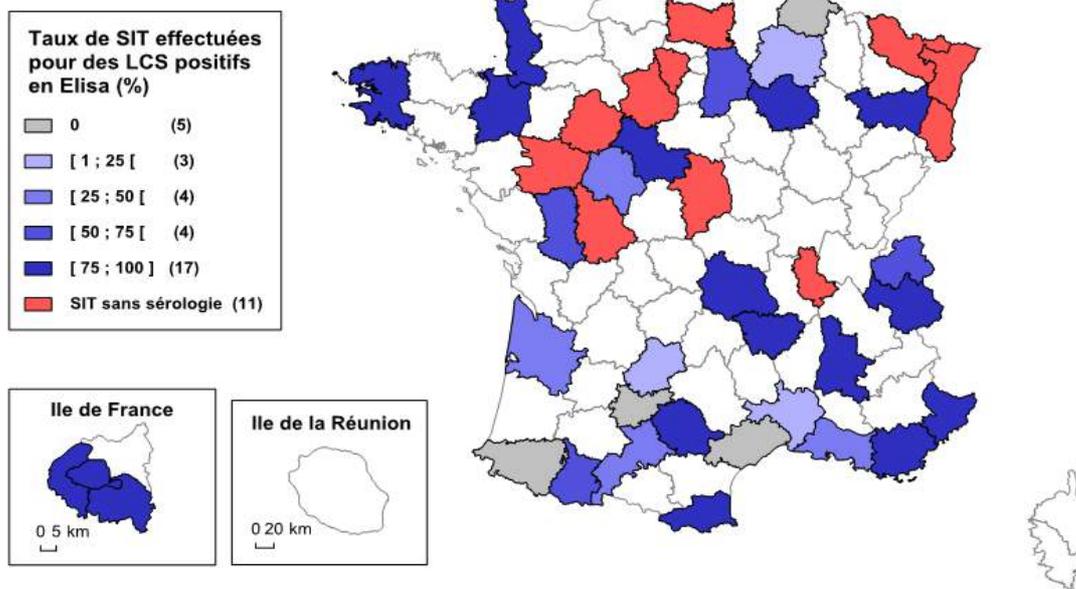
Parallèlement, les cliniciens du CHU de Strasbourg en ont prescrit 112 en 2015, par ailleurs 205 autres analyses ont été réalisées pour différents laboratoires (principalement de CH et de CHU).

2.1.4.3.2. Bilan de l'activité de confirmation des neuroborrélioses par synthèse intrathécale sur les 4 années de mandature du CNR Borrelia



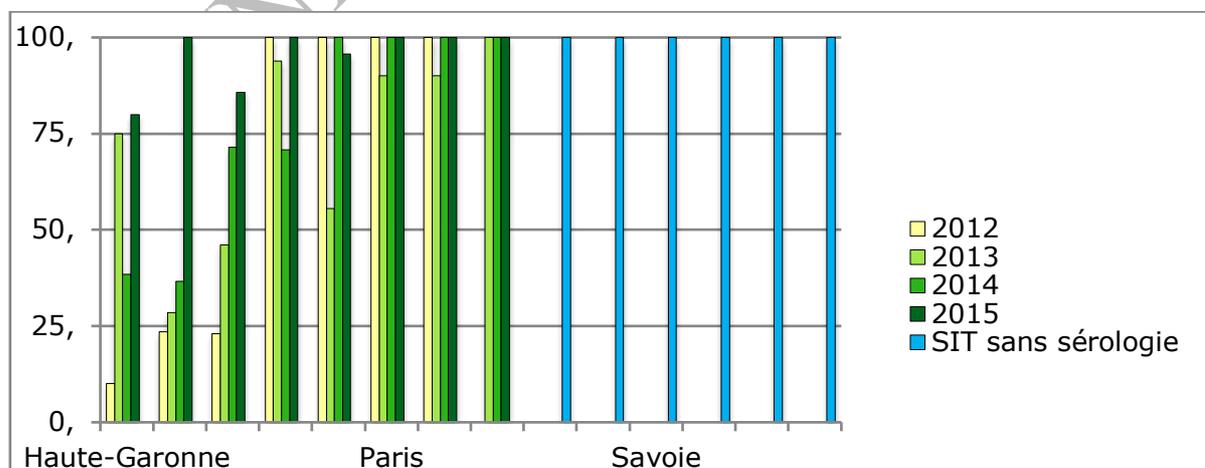
Les demandes de SIT ont significativement augmenté pendant les 4 ans du CNR. De même le nombre de SIT réalisées au CNR qui est passé de 239 en 2012 à 317 en 2015. Le nombre de SIT positives est cependant stable.

Taux des synthèses intrathécales effectuées sur LCS positifs en Elisa entre 2012-2015 (hors CHU Strasbourg)



« SIT **sans** sérologie » = dosage ELISA fait par le laboratoire - le CNR *Borrelia* ne n'a réalisé que la SIT proprement dite.

On voit qu'en 4 ans, de nombreux laboratoires ont adopté ce paramètre. La couverture nationale de réalisation de ce paramètre s'est améliorée, passant de 17 départements demandeurs en 2012-2013 à 33 départements en 2014 et 2015. Ceci est probablement lié à une meilleure communication sur l'importance de ce paramètre pour la confirmation du diagnostic des neuroborrélioses.



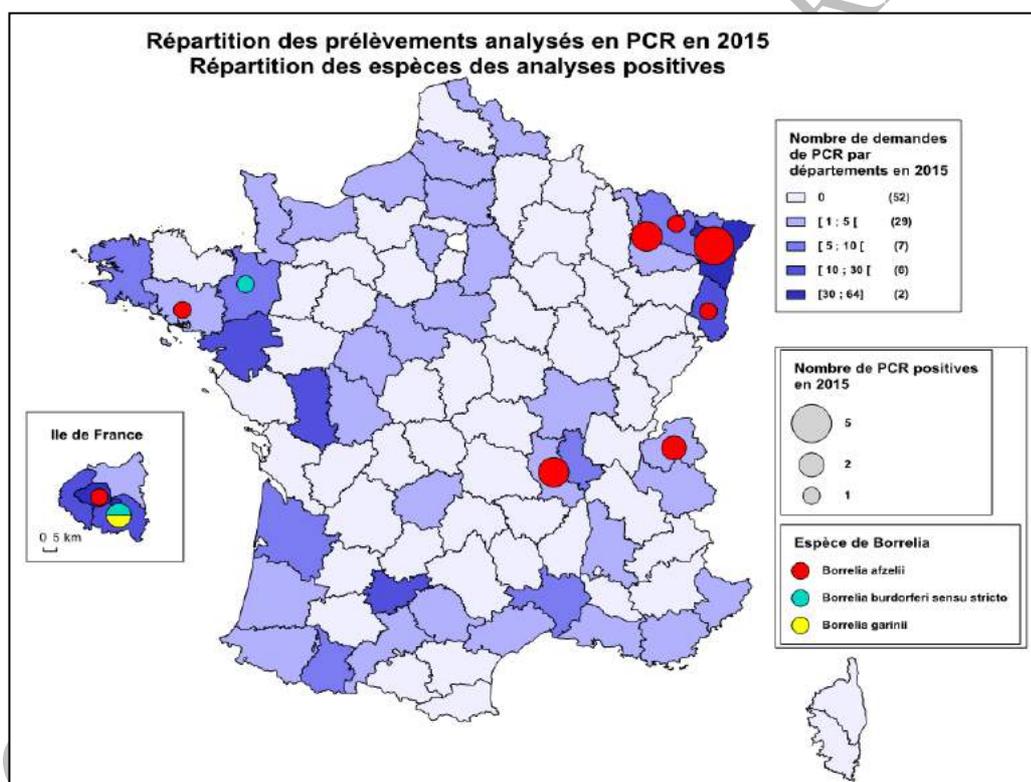
Parmi ceux-ci, les laboratoires de plusieurs départements (Haute-Garonne, Gironde, Indre-et-Loire) réalisant fréquemment (> 50 LCS testés/an) une sérologie *Borrelia* sur LCS, ont largement adopté ce paramètre, passant de 10-20% en début de mandat du CNR à > 80% de demandes de réalisation en 2015.

2.1.4.4. Activité d'expertise en PCR du CNR *Borrelia*

2.1.4.4.1. Expertise de prélèvements humains pour PCR en 2015

Pour recherche de *Borrelia* par PCR, 330 prélèvements provenant de 44 départements ont été adressés au CNR (carte ci-dessous). Ce nombre de demande a augmenté de 45 % par rapport à l'année précédente.

Parmi ces demandes, 8,7 % n'ont pas pu être réalisées car la nature de l'échantillon biologique n'était pas indiquée pour l'analyse (sérum, frottis de peau, abcès, sang sur tube EDTA).



Parmi les prélèvements analysables (302), on comptait 147 LCS, 67 prélèvements articulaires et 88 prélèvements divers (biopsies : cutanée, de tissu profond, de fragment d'articulation ; extrait ADN ; humeur aqueuse ; sang placentaire ; fragment de valve cardiaque et hémoculture).

Près de 46,8 % des prélèvements adressés étaient des LCS mais aucun n'était positif.

Parmi les prélèvements articulaires reçus, 5 étaient positifs (7,5 %) : 2 à *B. burgdorferi*, 2 à *B. afzelii*, 1 à *B. garinii*.

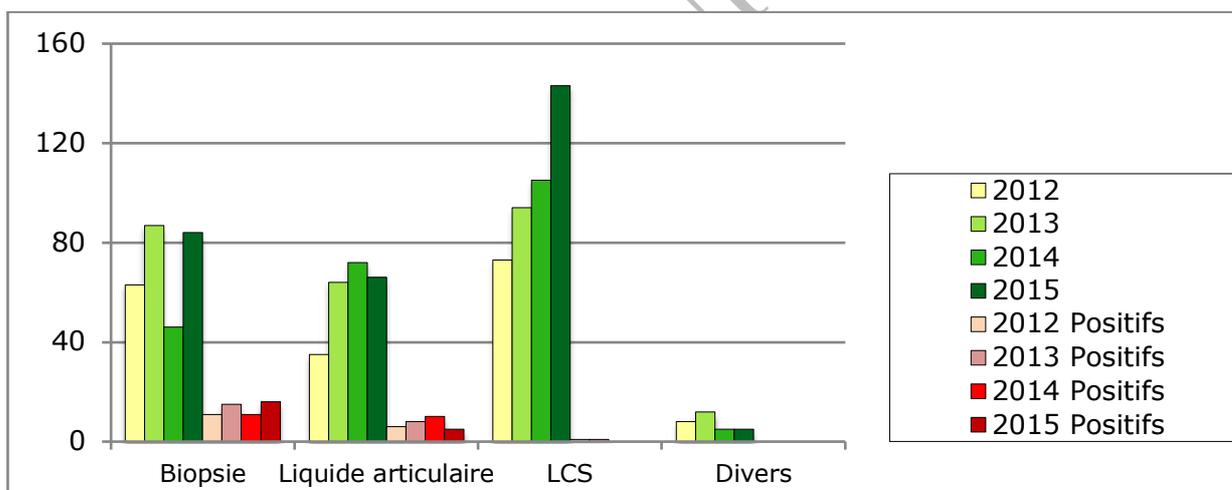
L'origine géographique des cas 5 d'arthrite de Lyme était diverse (Saint Mandé, Rennes, Créteil, Haguenau). Dans les cas renseignés, le tableau clinique correspondait toujours à une mono-arthrite du genou.

Enfin, parmi les 92 prélèvements divers, 16 biopsies étaient positives (17,4 %), toutes à *B. afzelii*. Dans les biopsies positives, 11 provenaient du « protocole biopsies cutanées » - Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borreliose de Lyme en France et 5 autres ont été adressées par l'Hôpital Tenon (Paris), CH de Nancy, Ch de Pringy, CH Alpes Leman et une maison de retraite (département 67).

Espèces de *Borrelia* détectées en PCR en 2015 selon la nature des prélèvements

Espèce de <i>Borrelia</i>	Prélèvements articulaires	LCS	Biopsies cutanées	Total
<i>B. afzelii</i>	2 (liquide synovial)	0	16	18
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	2 (liquide synovial)	0	0	2
<i>B. garinii</i>	1 (liquide synovial)	0	0	1
<i>B. burgdorferi</i> si non typable	0 (liquide synovial)	0	0	0

2.1.4.4.2. Expertise de prélèvements humains pour PCR - période 2012-2015

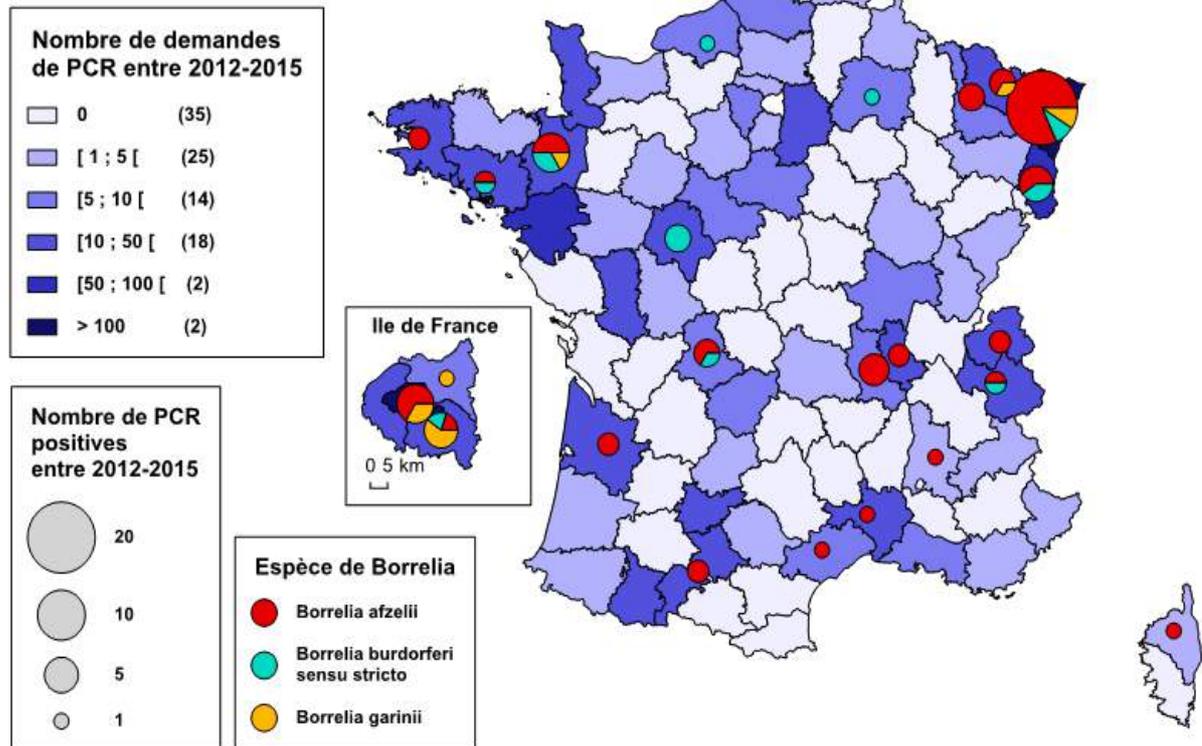


Le nombre de prélèvements adressés au CNR pour recherche de *Borrelia* a cru durant ces 4 années du mandat du CNR. L'analyse de ces variations par nature anatomique de prélèvement montre que ce sont les LCS qui ont représentés cette augmentation avec un doublement du prélèvement reçus en 4 ans, avec un seul échantillon détecté positif/an.

L'absence de positivité pour les LCS souligne la difficulté diagnostique directe des neuroborrelioses en raison du manque de spécificité des signes cliniques. Le manque de sensibilité de la recherche directe de *Borrelia* par PCR dans le LCS et la connaissance encore insuffisante des prescripteurs des examens complémentaires à réaliser en cas de suspicion de neuroborreliose (recherche préférentielle de la SIT spécifique et non recherche d'ADN par PCR) sont en partie responsables de cela. D'après la littérature, la PCR est à limiter aux 2 premières semaines d'apparition des signes cliniques et à faire en parallèle de la SIT.

Origine géographique des demandes et diversité des espèces de *Borrelia* détectées sur la période 2012-2014

Répartition de prélèvements analysés en PCR entre 2012-2015



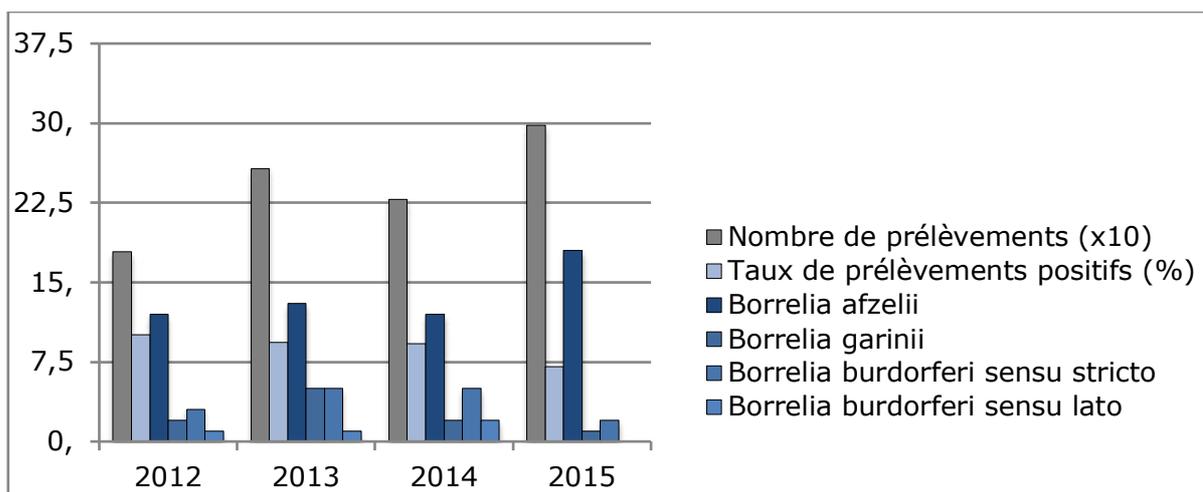
Pendant la mandature, 62 départements nous ont envoyés au moins un échantillon et 21 ont eu au moins un échantillon positif par PCR durant la même période.

Espèces de *Borrelia burgdorferi sensu lato* détectées en PCR entre 2012-2015 selon la nature des prélèvements

<i>Espèce</i>	<i>Biopsies cutanées</i>	<i>Prélèvements articulaires</i>	<i>LCR</i>	<i>Total</i>
<i>B. afzelii</i>	47	8	0	55
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	2	13	0	15
<i>B. garinii</i>	4	5	1	10
<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	1	2	1	4

L'espèce la plus fréquente dans les échantillons humains en France est *B. afzelii* (64,7%), puis *B. burgdorferi* (17,8%) puis *B. garinii* (11,9%). L'espèce causale n'a pu être déterminée pour 4 échantillons positifs en raison signal en PCR trop faible pour pouvoir être séquencé.

DONNEES DU CNR BORRELIA



On constate que cette répartition entre les espèces de *Borrelia* pathogènes est stable sur les 4 années.

Le taux d'échantillon positif est stable (50% environ, en accord avec la littérature européenne) sur les 3 premières années et proportionnel au nombre d'échantillons analysés chaque année par le CNR. Ce taux est plus bas sur la 4^{ème} année, en raison d'une augmentation du nombre de LCS analysés en 2015, dont le taux de positif est très faible dans tous les pays d'Europe

Au total, *B. afzelii* est l'espèce majoritaire en France. Aucun échantillon humain n'a été détecté positif pour les autres espèces de *Borrelia* et notamment *B. valaisiana*, *B. spielmanii* ou *B. lusitaniae* à ce jour, alors que celle-ci sont occasionnellement trouvées dans les tiques. Ces dernières espèces ne représentent donc pas une cause fréquente d'infection humaine à *Borrelia* en France, de même que dans les autres pays européens. Cette répartition globale des espèces pathogènes pour l'Homme en France est similaire à celle observée dans les pays voisins (Allemagne, Suisse).

A noter que les arthrites de Lyme sont en France le plus souvent dues à *B. burgdorferi* ss (13/28 positifs, soit 46% des cas).

2.1.4.4.3. Expertise de prélèvements humains pour le diagnostic de fièvres récurrentes

En 2015, nous avons réceptionné 16 demandes d'analyses pour suspicion de fièvres récurrentes entre février et décembre 2015.

Les prélèvements provenaient de la région parisienne pour 6 d'entre eux et de province pour 10 d'entre eux :

Dijon (n=2), Lyon (n=1), Rennes (n=1) Strasbourg et CHG de la région Alsace (n=4), Nice (n=1), et Toulouse (n=1).

Les 16 échantillons analysés, provenaient de 7 femmes entre 26 et 54 ans et 8 hommes entre 19 et 69 ans. La majorité de ces patients présentaient une fièvre récurrente ou non accompagnée ou non de signes associés.

Sur ces 16 échantillons analysés, seuls deux échantillons provenant d'un même patient (sang + LCS) étaient positives en 2015. Il s'agissait d'un homme de 35 ans ayant séjourné 1 semaine au Sénégal. Le premier épisode fébrile a eu lieu quelques jours après son retour. Son frottis sanguin coloré au MGG était négatif. Ceci confirme l'intérêt de ne pas limiter la recherche de fièvres récurrentes à un frottis sanguin et de coupler la microscopie à une recherche de fièvres récurrentes par PCR.

Ses symptômes ont régressé sous traitement par doxycycline avec une posologie de 200 mg/jour durant 10 jours.

Parmi les 14 patients négatifs, la grande majorité des demandes faisaient suite à des retours de séjour à l'étranger (Sénégal, Italie, Mozambique, Erythrée, Éthiopie, Turquie).

Divers symptômes parfois peu spécifiques étaient associés suivant les cas : syncopes, diarrhées, hypothermies, poussées fébriles, l'un présentait des épisodes fébriles depuis plus d'un an, un autre présentait des poussées fébriles suite à des voyages répétés au Sénégal. Pour l'un d'entre eux, les autres examens complémentaires ont permis de mettre en évidence une fièvre typhoïde.

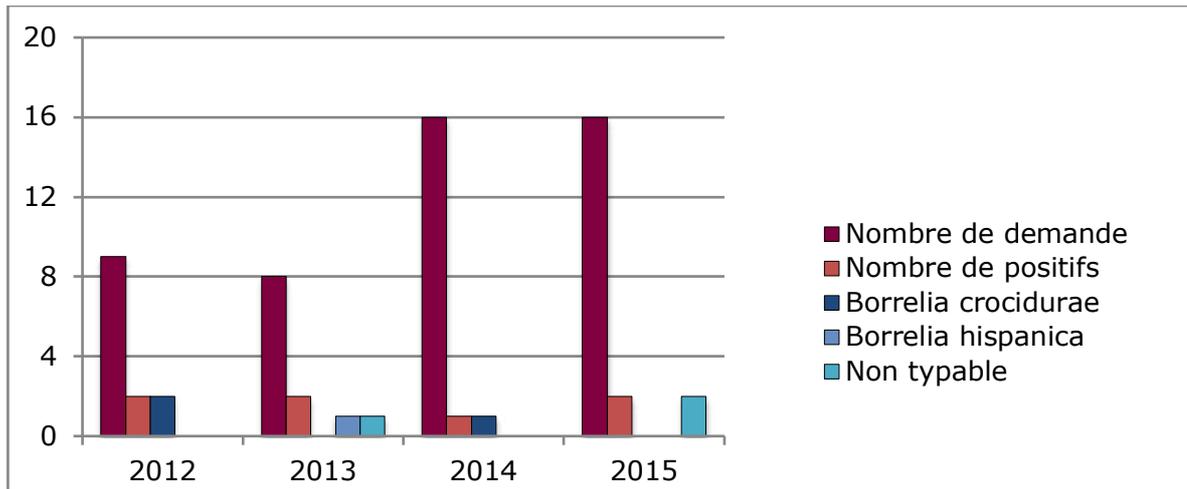
Plusieurs demandes correspondaient à des recherches pour des patients asymptomatiques ou sans facteur de risque : pas de voyage à l'étranger ou pas de récurrence de l'épisode fébrile, voire pas de fièvre du tout. Pour un de ces patients, il s'agissait d'un cancer. Pour une autre demande, il s'agissait d'une patiente ayant réalisé une analyse dans un laboratoire privé en Allemagne et qui avait montré dans son sang des « éléments spiralés » interprétés à tort comme étant des *Borrelia*.

Photo de *Borrelia* de fièvre récurrente

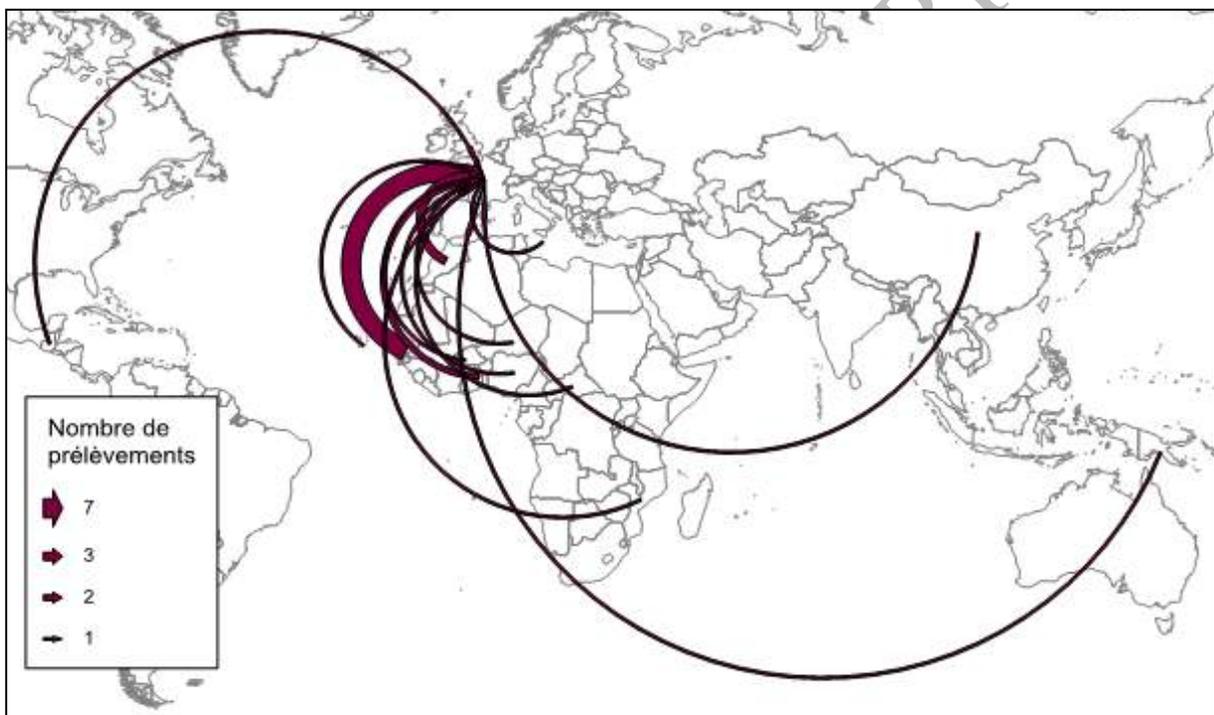
[Source : L. Zilliox, CNR *Borrelia*, Strasbourg (2014)]



Au total, en 4 ans le CNR *Borrelia* a analysé 49 échantillons pour recherche de *Borrelia* agents de fièvre récurrente.



Origine géographique des suspicions de fièvres récurrentes analysées entre 2012-2015 (lorsque des données de voyage étaient disponibles) :



Deux espèces ont été identifiées dans les cas positifs

Borrelia crocidurae et *Borrelia hispanica* :

- les 3 cas de *Borrelia crocidurae* ont pour origine des voyages au Sénégal (n=2) et au Maroc (n=1)
- le patient dont le prélèvement est positif à *Borrelia hispanica* revenait d'un voyage au Maroc
- les deux patients positifs pour des espèces de *Borrelia* du groupe fièvres récurrentes non typables après séquençage avaient pour origine des voyages au Sénégal (2 cas et 3 prélèvements).

2.1.5. Envois extérieurs de matériel biologique par le CNR *Borrelia*

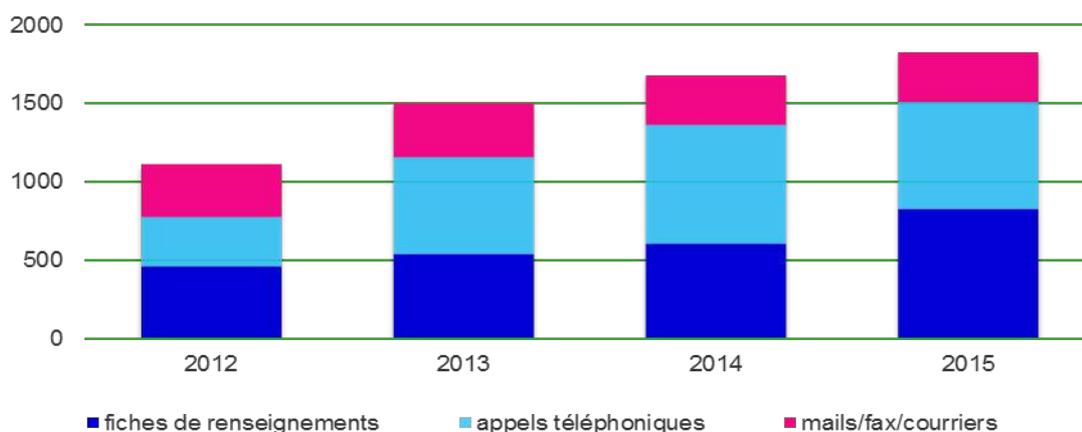
Tout au long de sa mandature, le CNR *Borrelia* a procédé chaque année à différents envois extérieurs nationaux. Ces envois de matériels biologiques (ADN et/ou culots bactériens de *B. burgdorferi* sensu lato) ont été réalisés sur demande des destinataires dans le cadre de projets de recherche sur la borréliose de Lyme, de mise au point de protocoles de diagnostic et/ou de typage de *B. burgdorferi* sensu lato ou de projets concernant la réponse immunitaire après infection par *Borrelia*.

Matériel biologique	Souche	Projet	Destinataire
Extraits d'ADN	<i>B. lusitaniae</i> (Poti B2)	Recherche sur écologie de la maladie de Lyme	Drs Kilbride et Biek Institute of biodiversity, animal health and comparative University of Glasgow
Extraits d'ADN	<i>B. afzelii</i> (VS461 et 1895/97) <i>B. garinii</i> (20047) <i>B. lusitaniae</i> (Poti B2) <i>B. valaisiana</i> (VS116) <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (B31)	-Protocole de détection et d'amplification -Recherche « détection de <i>Borrelia</i> et oiseaux de mer »	Dr Karen Mc Coy MIVEGEC, CNRS/IRD Unité : Interactions parasitaires et Adaptations Montpellier
Extraits d'ADN Culots bactériens	<i>B. afzelii</i> (IBS 42) <i>B. garinii</i> (IBS 18)	Témoin de typage	Dr G. Voure'h INRA Clermont Ferrand
Sérums	Sérums de forestiers Sérums positifs en anticorps anti-Bbsl <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> B31	-Recherche de pathogènes	Pr Raoult/Lionel Almeras CNRS-URMITE Rickettsia Pr Philippe Parola/Lionel Almeras
Extraits d'ADN de tiques d'élevage	Tiques potentiellement infectées par <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> 297c4	- « détection de <i>Borrelia</i> dans les tiques par spectrométrie de masse »	Veille et Approche Entomologique des Maladies Vectorisées Emergentes Marseille
Culots bactériens Biopsies cutanées	<i>B. garinii</i> (PBi, cPBi) <i>B. afzelii</i> (163/98) <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (297, c297/4)	Protéomique <i>Borrelia</i>	Dr Laurence Sabatier et Gilles Schnell IPHC-ECPM, Laboratoire de Spéctrométrie de Masse Bio- Organique Strasbourg
Tubes Vacutainer®	/	Prélèvements de poussins manchots royaux	Dr Le Bohec Laboratoire Européen Associé « BioSenib » Monaco

Antigène	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (297)	Sérologie <i>Borrelia</i> sur les rongeurs du Grand Est	Franck Boue Unité pathologie des animaux sauvages ANSES. Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy Malzéville
Extraits d'ADN	/	Expertise de prélèvements autopsiés	Dr Fanny Renois Laboratoire de virologie médicale et moléculaire CHU Reims
Broyats de cellules infectées	/	Recherche « réponse des fibroblastes à l'infection par différentes espèces de <i>Borrelia</i> »	Dr. Wassila Carpentier Plateforme Post-génomique de la Pitié Salpêtrière Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie Paris
Culots bactériens Extraits d'ADN Antigène Sera	<i>Borrelia afzelii</i> IBS 26, IBS 39, IBS 51 <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> B31 <i>Borrelia garinii</i> 20047 <i>Borrelia afzelii</i> VS461 <i>Borrelia turdi</i> Sérum de souris CH3 positif en IgG et IgM	« impact of chronic bacterial infection on NKT cell lymphomagenesis in mice and humans »	Rémy Robinot Laboratoire INSERM U1111/CIRI Lyon
Extraits d'ADN	<i>B. afzelii</i> (VS461 et 1895/97) <i>B. garinii</i> (20047) <i>B. valaisiana</i> (VS116) <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (B31) <i>B. spielmanii</i> (A14S)	Mise au point technique de détection	Dr Bertille Gentin Laboratoire Vétérinaire du 55 LVL55-SEGILAB Bar Le Duc
Extraits d'ADN	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> B31 <i>Borrelia garinii</i> 20047 <i>Borrelia afzelii</i> VS461 <i>Borrelia valaisiana</i> VS116 <i>Borrelia spielmanii</i> A145	Mise au point technique PCR	Laboratoire des Pyrénées et des Landes (Lagor)
Culture bactérienne	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> N40	Projet « Trib1 et lupus »	Dr Pauline Soulas-Sprauel IBMC (Strasbourg)
Extraits d'ADN	442 échantillons	Projet de recherche sur <i>Borrelia miyamotoi</i>	Dr. Hein Sprong National Institute of Public Health and Environment (RIVM) Laboratory for Zoonoses and Environmental Microbiology Bilthoven (Netherlands)

Culots bactériens	IBS 2, IBS 3, IBS 6, IBS 7, IBS 8, IBS 9, IBS 18, IBS 20, IBS 29, IBS 35, IBS 59	Projet de recherche « Séquençage <i>Borrelia garinii</i> d'origine humaine »	Xavier Bailly (Ingénieur de recherche) UR 0346 Epidémiologie Animale INRA de Theix
Extraits d'ADN	<i>Borrelia valaisiana</i> VS116 <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> B31	Contrôles pour PCR en temps réel	Dr. Sarah Moutailler (PhD) ANSES, Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort

2.2 Information, formation et conseil aux professionnels ou aux autorités de santé



En résumé : au cours de la période 2012-2015, les membres du CNR *Borrelia* ont participé à la formation et à l'information de personnels médicaux (cliniciens, biologistes, pharmaciens d'officine, et vétérinaires libéraux), à l'information du grand public et ont dispensé de nombreux conseils aux particuliers et patients.

La formation d'étudiants a également été importante soit dans le cadre de cours spécifiques, soit dans le cadre de l'unité de recherche EA 7290 : virulence bactérienne précoce : groupe *Borrelia* (Université de Strasbourg).

Une partie importante de ces activités de formation s'est notamment réalisée au sein du Comité de pilotage : « *Alsacétique* » initié en 2012. La thématique « *Tiques et maladies transmises par les tiques* » fait actuellement partie de l'axe "maladies infectieuses" du Projet Régional de Santé (PRS) Alsace.

2.2.1 Enseignement sur la thématique

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

« *Borrelia* ». B. JAULHAC, cours de Bactériologie Médicale, Institut Pasteur Paris, dispensé tous les deux ans.

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

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

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

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

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

« La borréliose de Lyme » - Faculté de pharmacie de Strasbourg, **N. BOULANGER**, 6^{ème} année : - Faculté de médecine, **N. BOULANGER** et 3^{ème} année : Les tiques et maladies transmises.

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

2.2.2 Formation médicale continue aux professionnels de santé

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

- pour les médecins : 30 séances de FMC des biologistes des hôpitaux, FMC et DPC pour les médecins généralistes
- pour les pharmaciens : formation continue des pharmaciens d'officine APPEPU en Alsace (4 demi-journées), UTIP en Lorraine (3h)
- pour les vétérinaires de terrain : dans le cadre de conférences associant un membre du CNR (Sylvie De Martino ou Benoît Jaulhac) et un enseignant d'une école vétérinaire (Toulouse, Nantes). Sept symposia organisés par la société Bayer - Santé Animale, ont eu lieu dans différentes villes de France.

2.2.3 Information médias « grand public » et site internet

► Médias

Le CNR a fait l'objet de nombreuses sollicitations de la part des médias « grand public » de la presse écrite ou télévisée, régionaux et nationaux.

A titre d'exemple, sur l'année 2014 :

- ◆ **France 5** (Magazine de la santé, émission d'une heure, mai 2014, reportage sur site)
- ◆ **Canal +** (Spécial investigation, émission d'une heure, octobre 2014, reportage sur site)

- ◆ **Le Monde** pages scientifiques (3 x 2h1/2 d'interview téléphonique)
- ◆ **Le Nouvel Observateur** (2h d'interview téléphonique, octobre 2014)
- ◆ **Radio Canada**

Parallèlement aux sollicitations directes du CNR, de nombreux articles paraissent régulièrement dans la presse régionale ou nationale sur ce sujet chaque année depuis 2014, et sont largement alimentés par la médiatisation du débat actuel sur la maladie de Lyme.

► Le site internet du CNR



- ◆ Adresse site : <http://www.chru-strasbourg.fr/Les-centres-de-referenc/Borrelia>
- ◆ Date de création : 2013
- ◆ Date de la dernière mise à jour : 12 mars 2015

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

Durant la mandature, nous avons proposé chaque année aux laboratoires d'analyses médicales volontaires du Nord-Est de la France, un contrôle de qualité externe (EEQ) pour la sérologie de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Avec l'aide logistique d'une association (Biologie Prospective, Nancy nous avons diffusé tous les trimestres un sérum aux laboratoires participants).



La dernière analyse des EEQ de 2015 révèle que, parmi les 210 laboratoires participants, jusqu'à 13 trousse EIA différentes ont été utilisées. Onze d'entre elles permettaient la détection séparée des IgG et des IgM anti *B. burgdorferi*, les 3 autres permettaient la détection des Ig totales, les techniques IgG+IgM combinées étaient en 2015 utilisées par 1,5 % (contre 6 % en 2014) des laboratoires participant à cet EEQ. Ce taux est donc en nette diminution : - 4,5 % par rapport à 2014 et -19,5 % par rapport à 2013, où 20% des laboratoires participants utilisait ce genre de trousse.

La technique IgG et IgM séparées de BioMérieux est largement majoritaire avec près de 55 % des laboratoires participants qui l'utilisent. Parmi les autres coffrets, Diasorin représente comme les trois années précédentes, le 2^{ème} choix en termes de fréquence d'utilisation (près de 28%).

Une technique de confirmation (WB ou immunoblot) a été utilisée par près de 25 % des participants qui utilisent des coffrets de divers fournisseurs (Bioadvance, Alldiag, Diasorin, Ingen, Viramed).

Les 4 sérums fournis par le CNR comme contrôles de qualité externe (EEQ) étaient :

N°1 : sérum positif en IgG et IgM associé à un cas clinique de suspicion d'érythème migrant : 90,8 % de réponses exactes en IgM et 94,3 % en IgG. Il est à noter que près de 25 % des participants ont réalisé des techniques de confirmation par western blot IgM et IgG.

Les résultats des ces tests de confirmation étaient conformes dans 84,1 % en IgM (WB IgM attendu positif) et 70 % en IgG (WB IgG attendu négatif).

La conformité des réponses aux items d'interprétation avoisinait les 80 %, hormis pour deux items :

- **le premier** item était relatif à la compatibilité de ces résultats avec une cicatrice sérologique. Seuls 30 % des participants ont considéré cette hypothèse. Les autres ont considéré que cette réponse d'anticorps ne pouvait être que la résultante de l'érythème migrant
- **le deuxième** item dont le taux de réponses correctes avoisinait seulement 70 %, concernait le contre le sérologique post thérapeutique. Cette question révèle que 30 % des participants considèrent à tort la sérologie comme pouvant un marqueur d'efficacité thérapeutique, alors que même après l'éradication bactérienne, la persistance des anticorps demeure.

N°2 : sérum négatif en IgM et en IgG associé à une suspicion clinique de d'acrodermatite atrophiante (ACA) : 99 % de réponses exactes en IgM mais près de 36 % de faux positifs ont été observés en IgG, majoritairement avec une même trousse. Ce problème a été signalé au fabricant via Biologie Prospective.

- Les taux de réponses exactes aux différents items étaient plus faibles que pour le 1er premier sérum, variant de 50 % à 85 %. Près de la moitié des participants ne semblent pas avoir la notion de la présence d'un taux élevé d'IgG spécifiques en cas de réelle ACA.

N°3 : sérum positif en IgG et négatif proche du seuil en IgM associé à un cas clinique de suspicion d'arthrite de lyme : si 99,5 % des adhérents ont bien dépisté les IgG, près de 20% ont rendu des IgM positifs avec des trousse d'EIA différentes. Les réponses correctes aux

différents items avoisinent ou dépassent 90 % sauf pour l'item relatif à la compatibilité du résultat avec une cicatrice sérologique, où 25 % des participants hésitent encore.

N°4 : sérum positif en IgG et négatif en IgM associé à une suspicion clinique de neuroborréliose : en IgG comme en IgM, le taux de résultats corrects est de 98,4 % et 10,3 % de douteux ont été observés en IgM avec diverses techniques. Les réponses correctes aux différents items avoisinent ou dépassent 90 % sauf pour deux items.

Près de 20 % des adhérents hésitent à proposer de compléter la sérologie sanguine par une analyse sur LCS, alors que cette analyse est incluse dans les critères diagnostiques de la neuroborréliose. Par ailleurs, près de 93 % préconisent inutilement de contrôler la sérologie sur un deuxième prélèvement après traitement.

Cette campagne d'EEQ a été suivie en 2015 par de nombreux LABM. Leur participation a plus que doublé depuis 2012. L'analyse des résultats révèle que les techniques sérologiques sont maîtrisées par la majorité des laboratoires. L'amélioration de l'interprétation des résultats a été effective auprès des participants durant les 4 années du mandat, puisque ces EEQ ont permis de rappeler certaines connaissances utiles pour la prestation de conseil diagnostique et thérapeutique des biologistes envers des cliniciens.

2.2.5 Participation à l'organisation par l'ANSM d'un Contrôle de Qualité Externe (EEQ)

En 2014, le CNR *Borrelia* a participé à la réalisation du Contrôle National de Qualité Bactériologie - 14BAC2, pour la sérologie *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl). Le rôle du CNR a alors été de qualifier des sérums, de participer à la rédaction des cas cliniques et du formulaire de saisie des réponses des laboratoires participants. Puis le CNR a analysé avec l'ANSM l'ensemble des réponses des laboratoires participants et des commentaires ont été rédigés en commun afin de répondre aux éventuelles dérives constatées lors de cet EEQ.

Un compte rendu global d'analyse des résultats a pu ainsi être diffusé en 2015 par l'ANSM.

Les 3 sérums sélectionnés correspondaient aux cas cliniques suivants :

- Cas N°1 : cas d'érythème migrant, sérum négatif en IgG et en IgM
- Cas N°2 : cas d'arthrite de Lyme, sérum positif fort en IgG et négatif en IgM
- Cas N°3 : patient présentant des signes cliniques subjectifs chroniques sans symptômes spécifiques objectifs, sérum négatif en IgG et négatif en IgM.

Cet EEQ était destiné à l'ensemble des laboratoires français. En tout, 424 participants ont répondu à l'EEQ.

Pour chaque cas clinique associé à un sérum, plusieurs questions étaient posées. L'analyse des réponses à la prestation de conseil auprès des cliniciens prescripteurs est détaillée ci-dessous :

Question n°1 : Devant ce contexte clinique, la sérologie de la borréliose de Lyme prescrite par le médecin a-t-elle un intérêt ?

- ➔ **Connaissance de l'intérêt de la prescription d'une sérologie de Lyme**

En cas d'érythème migrant (cas n°1), qui correspond à la phase primaire de l'infection à *Borrelia*, près de 30 % des biologistes considèrent à tort que la sérologie de Lyme est indiquée. Or, cette dernière est négative dans 50 % des cas en Europe, même avec les méthodes les plus sensibles.

En cas d'arthrite de Lyme (cas n°2), la majorité des biologistes reconnaissent à raison la valeur de la sérologie de dépistage pour poser le diagnostic.

En l'absence de consensus, en cas de signes généraux chroniques sans symptômes cliniques objectifs, la majorité des biologistes optent pour la réalisation d'une sérologie de Lyme.

Question n°2 : En fonction du contexte clinique, le résultat du dépistage sérologique obtenu est-il compatible avec le diagnostic de borréliose de Lyme ?

➔ **Appréciation de la compatibilité de la sérologie de dépistage avec le diagnostic borréliose de Lyme, au regard du cas clinique**

Cette appréciation était hétérogène en fonction du stade clinique :

- en phase primaire, près de 20 % des biologistes attendent à tort une sérologie positive en phase primaire d'infection par *Borrelia*;
- en phase tardive d'infection par *Borrelia* (arthrite) la majorité des biologistes ont bien la notion qu'une sérologie positive en IgG étaye le diagnostic. En cas de signes non spécifiques chroniques, leur appréciation est également cohérente concernant les IgM qui n'ont pas de valeur pour le diagnostic de borréliose de Lyme.

Question n°3 : En fonction du contexte clinique et du résultat sérologique obtenu, conseillerez-vous un traitement antibiotique pour ce patient ?

➔ **Capacité à transmettre un conseil thérapeutique adéquat**

- Lors de la phase primaire, plus de 20 % des biologistes ne conseillent aucun traitement antibiotique, alors que ce traitement est impératif afin de prévenir l'apparition de formes cliniques disséminées. En phase tardive d'arthrite à *Borrelia*, près de 10 % sursoient également à tort au traitement.
- Par contre une large majorité déconseille à raison de traiter en cas de signes généraux chroniques sans symptômes cliniques objectifs avec une sérologie de Lyme négative en IgG.

Question n°4 : Si un traitement antibiotique est instauré, conseillerez-vous un contrôle sérologique un mois après la fin du traitement ?

➔ **Connaissance de l'intérêt du suivi de la sérologie de Lyme**

- Plus des 2/3 des participants ont bien intégré qu'un contrôle sérologique pour le suivi des patients traités est sans intérêt. La surveillance post-thérapeutique est clinique et la persistance des anticorps spécifiques est inéluctable même après guérison des phases tardives de l'infection.
- Cependant, ce point demeure encore imprécis pour près de 20 % des participants. Cela pourrait avoir un impact non négligeable sur le risque de dérive du conseil thérapeutique avec possible proposition d'antibiothérapie répétée ou au long cours injustifiée.

Question n° 5 : Sur cet échantillon les examens complémentaires suivants sont-ils utiles ?

➔ Connaissance de la valeur des IgM spécifiques dans le diagnostic sérologique de la borréliose de Lyme

- Plus de 77 % des participants savent que la présence d'IgM spécifiques n'a pas de valeur diagnostique au regard des cas cliniques n° 1 et 3. Dans le cas n°1, en phase primaire, la clinique permet de poser le diagnostic. Dans le cas n°3, lors de manifestations chroniques non spécifiques, et si les IgM ont été dépistées positives ou douteuses, une réaction croisée en lien avec une pathologie autre infectieuse ou dysimmunitaire est à suspecter fortement.

- Près de 64 % de participants n'accordent à raison aucune valeur à la présence d'IgM spécifiques en cas d'arthrite de Lyme du cas n°2, où les IgM pouvant être absentes ne constituent donc pas un marqueur d'activité. Mais quasiment 20 % semblent leur donner néanmoins une valeur diagnostique, ce qui risque générer une dérive d'interprétation avec un risque de conclure à tort à une absence d'infection active en cas d'absence d'IgM.

➔ Connaissance des indications de réalisation des tests de confirmation en immunoempreinte IgG et IgM

- Plus de 80 % des participants connaissent les indications des tests de confirmation par immunoempreinte IgG ou IgM. Cependant, 30% des biologistes proposent à tort une immuno-empreinte IgM en cas d'arthrite, où seul le dépistage IgG est positif. Le western blot IgM est inutile en l'absence de dépistage d'IgM négatif et n'apporte pas d'information supplémentaire dans ce contexte clinique. De plus, cette technique ne s'avère pas plus sensible que l'ELISA. C'est pourquoi elle n'est prise en charge par le système de santé qu'en cas de dépistage positif ou douteux quelque soit l'isotope d'Ig ciblé (NABM).

En résumé, la réalisation de ce contrôle de qualité national du diagnostic sérologique de la borréliose de Lyme révèle un bon niveau de connaissances théoriques et de compétences techniques chez ces participants dont les résultats et les réponses aux questions sont conformes à ce qui est attendu dans près de 82 %. Cet exercice a également permis de préciser les faiblesses de certaines connaissances susceptibles d'impacter la qualité de la prestation de conseil des biologistes vis-à-vis des cliniciens.

2.2.6 Guides élaborés

2.2.6.1 REMIC 5ème édition (Référentiel en microbiologie)

Chapitre sur *Borrelia burgdorferi* sensu lato

(Contexte épidémiologique et clinique ; Objectifs ; Prélèvements ; Méthodes diagnostiques avec les techniques immunoenzymatiques et d'immuno-empreinte et leur interprétation)

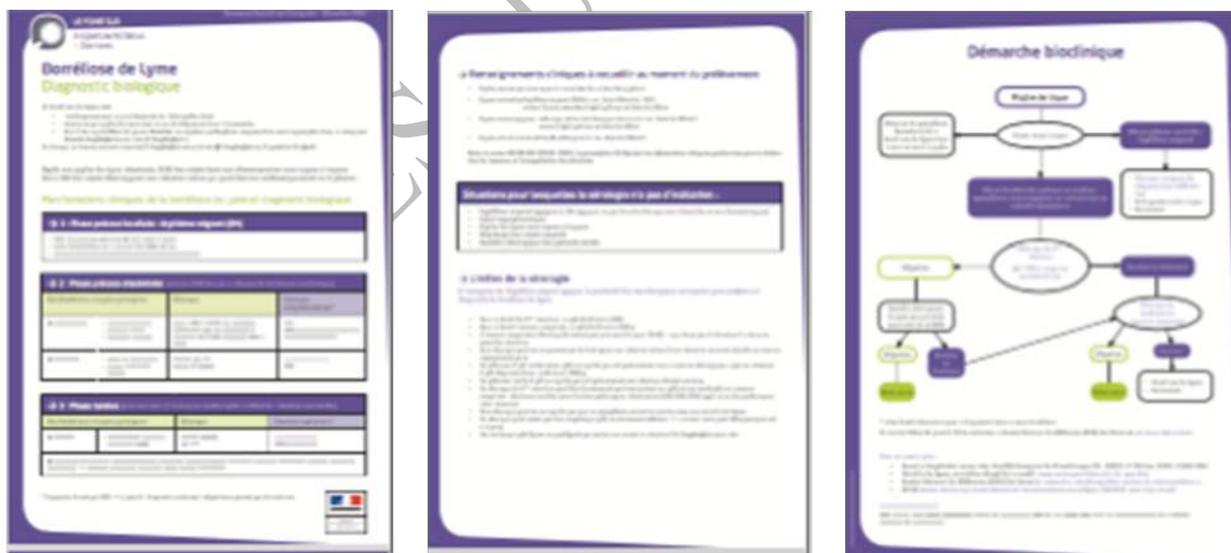
S. DE MARTINO, B. JAULHAC

2.2.6.2 Plaquettes pratiques pour les cliniciens et les biologistes

Sous l'égide de la Direction Générale de la Santé, le CNR a participé en 2015 à la réalisation de deux plaquettes d'information faisant le point sur le diagnostic clinique et biologique de la borréliose de Lyme. Ces plaquettes ont été validées par plusieurs sociétés savantes et collègues professionnels (infectiologie, rhumatologie, dermatologie, neurologie, microbiologie, médecine générale) et diffusées aux professionnels au courant du premier semestre 2016. Elles expliquent la démarche diagnostique en fonction des renseignements anamnestiques et cliniques et les limites de la sérologie pour l'aide au diagnostic de la borréliose de Lyme.

Elles sont disponibles sur le site de la DGS :

<http://social-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-infectieuses/article/maladie-de-lyme>



2.3 Contribution à la surveillance épidémiologique

2.3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections humaines à *Borrelia* et autres pathogènes transmis par *Ixodes ricinus*

Le CNR des *Borrelia* centralise tout au long de chaque année des données provenant de différents axes de surveillance :

- Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme, *via* des fiches de renseignements cliniques qui accompagnent les demandes d'analyses qui nous sont adressées par des cliniciens répartis sur le territoire national
- Surveillance de la diversité des souches pathogènes humaines réalisée *via* le Projet de Recherche Interne « biopsies cutanées » démarré lors du mandat précédent du CNR
- Surveillance régionale des cas d'anaplasmose granulocytaire humaine dans la région Nord-Est.

Les données ci-dessous rendent compte et synthétisent ces activités durant la mandature, en faisant un focus sur les différentes catégories cliniques recensées durant cette année 2015.

2.3.1.1 Surveillance nationale des cas de suspicion de borréliose de Lyme

Le CNR des *Borrelia* centralise tout au long de l'année des données provenant de fiches de renseignements associées à des prélèvements pour demandes d'analyses et d'expertise. Il centralise également de nombreux appels téléphoniques de divers interlocuteurs (médecins généralistes et spécialistes, dont les biologistes médicaux et divers courriers électroniques ou papiers et fax. L'importance comparée de ces trois axes de surveillance est synthétisée dans le graphe suivant.

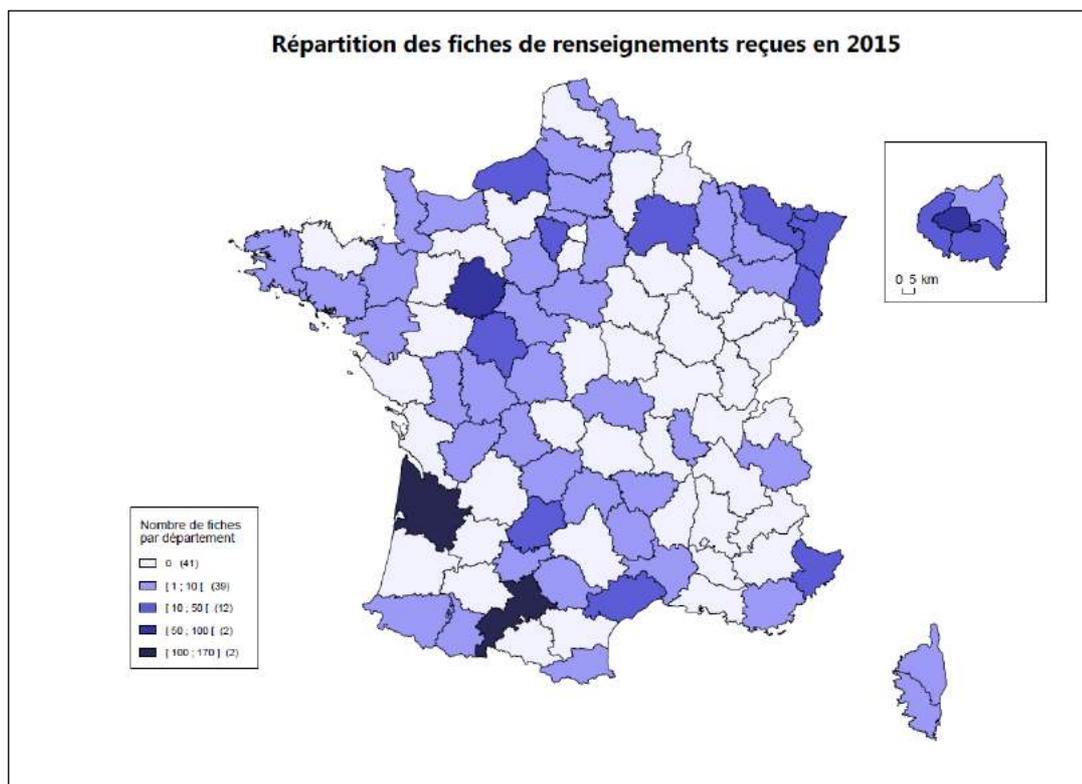
Durant ces quatre années de mandature, le nombre de fiches de renseignements (voir annexe) et d'appels téléphoniques n'a cessé d'augmenter, de respectivement + 80,5 % et + 116,6 % en 2014 et en 2015. Cette croissance d'activité est corrélée, entre autre, à la couverture médiatique intense depuis au moins 3 ans.

En 2015, nous avons analysé les fiches de renseignements afin de recueillir les informations sur les différents items de ces fiches (âge, sexe, facteur(s) de risque(s), épidémiologie, clinique, ...).

Les données ont été préalablement réunies puis saisies dans un fichier Excel® contenant la retranscription manuelle des fiches de renseignements de chaque année du CNR des *Borrelia*, les résultats biologiques issus du serveur de résultats d'analyses. Chaque cas a été ensuite classé en différentes catégories en fonction des critères diagnostiques de l'EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis : voir annexe).

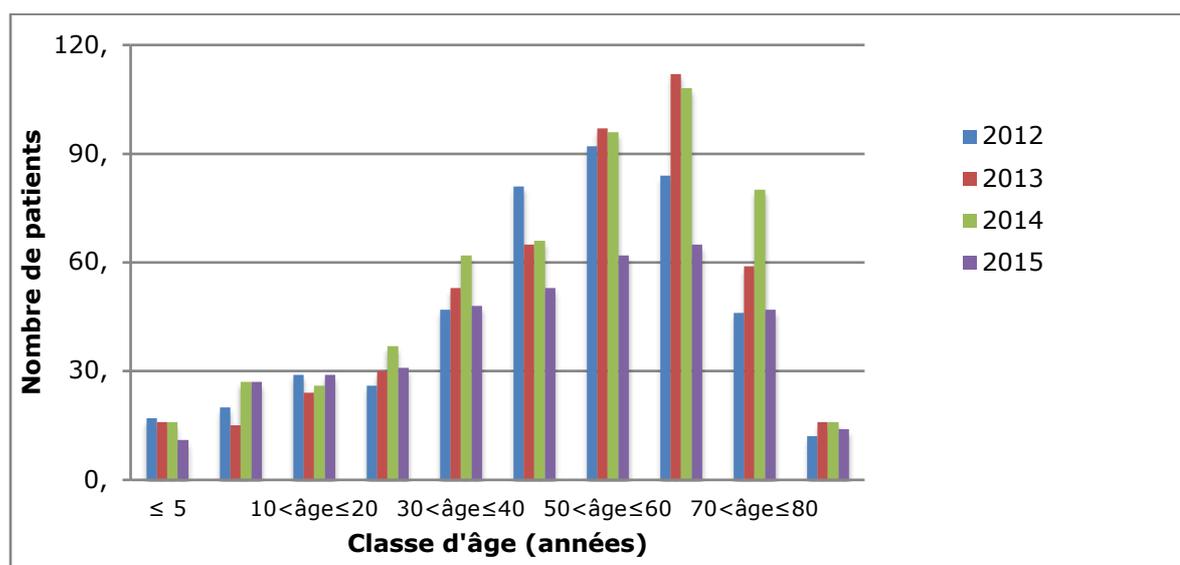
Durant l'année 2015, 827 fiches de renseignements ont été reçues contre 607 en 2014, soit une augmentation de près de 36%. Cette augmentation annuelle est importante par rapport aux années précédentes où elle était de près de 15% par an en 2013 et 2014. La majorité des fiches réceptionnées provenaient de Centres Hospitaliers régionaux (262/827 soit 31,7 %) et de Centres Hospitaliers Universitaires (525/827 soit 63,5 %), soit 95,2 % provenant d'un hôpital (contre 90,3 % en 2014, 97,8 % en 2013 et 92,6 % en 2012).

Parmi ces fiches, 19,2 % (159 sur 827) ont été insuffisamment remplies en 2015 voire totalement inexploitable contre 7,2 % en 2014. Afin de pallier cette insuffisance, nous avons informé les prescripteurs que les dossiers inexploitable sur le plan épidémiologique ou clinique ne pouvaient pas être utilisés pour les activités de surveillance du CNR et ne pouvaient donc pas bénéficier de la prise en charge financière des analyses par le CNR *Borrelia* et seraient facturées.



Les fiches qui ont pu être analysées proviennent principalement des CHU, comme Toulouse (167 fiches soit 20,2 %), Bordeaux (163 fiches reçues soit 19,7 %), ou Paris (67 fiches soit 3,1 %) ou des CH comme Le Mans (69 fiches soit 8,3 %). Le reste des demandes provient d'environ 90 établissements répartis sur l'ensemble du territoire. Dans ces derniers, le nombre de demandes varie globalement de 1 à 30 (soit 0,1 - 4 % des fiches de renseignements). Cette répartition est globalement stable depuis 2012.

Représentation du nombre de patients concernés, par classe d'âge, de 2012 à 2015

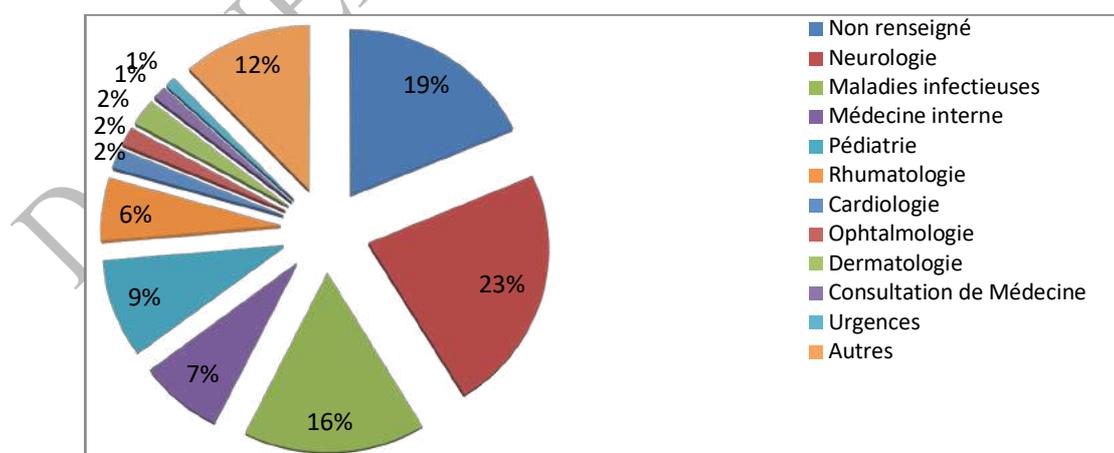


La répartition selon le sexe montre 54,8 % de cas masculins (457/827) et 45,29 % de cas féminins (374/827). Le sexe ratio des patients est de 1,2 en 2015 tout comme en 2014 et stable depuis 2013 (1,1 %).

L'âge des patients variait de 1 an à 95 ans, cette distribution est stable par rapport à 2014 et 2013. Il n'y a pas de différence significative entre les hommes et les femmes. Les patients de 50 à 70 ans sont les plus concernés par les analyses pour diagnostic de borréliose : cette catégorie est probablement plus exposée au risque de contamination (augmentation du temps de loisirs en pleine nature, etc).

La répartition des fiches en fonction des spécialités hospitalières est semblable aux années précédentes.

Distribution des fiches de renseignements selon les spécialités médicales



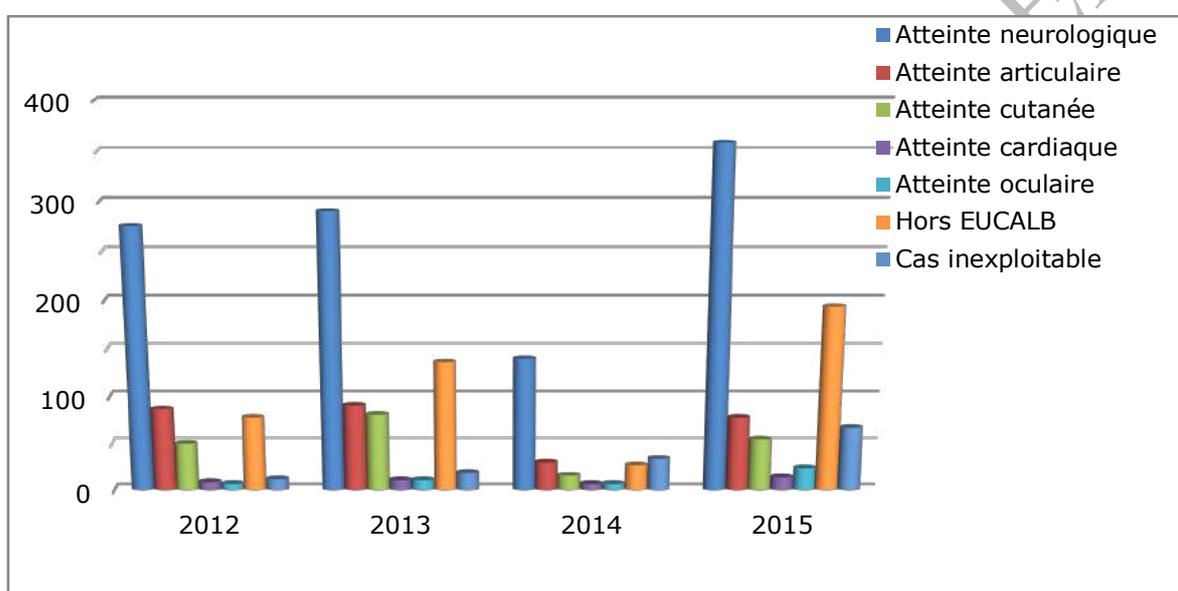
La neurologie est, de façon stable depuis 2012, la spécialité la plus demandeuse avec 23 % des demandes. Ceci est dû au fait que les diagnostics délicats s'orientent le plus souvent vers la

suspicion de neuroborréliose et que les neuroborrélioses sont la forme disséminée la plus fréquente en Europe.

Les 463 autres fiches analysables, soit 58,5 %, provenaient d'autres spécialités : maladies infectieuses, médecine interne, pédiatrie, urgences, rhumatologie et maladies infectieuses et tropicales (SMIT). La catégorie « Autres » regroupe des spécialités peu demandeuses comme la dermatologie, la réanimation, l'hématologie, l'ORL, la gériatrie, la néphrologie, etc.

Répartition des cas cliniques en fonction du type d'atteinte clinique de 2012 à 2015 :

Les différents cas de 2012 à 2015 ont été classés par type d'atteinte d'après les critères diagnostiques de l'EUCALB et les renseignements complémentaires utiles. Ils sont représentés sur le graphique ci-dessous :



En 2015, comme les autres années, **les demandes d'aide au diagnostic concernent principalement les patients avec des atteintes neurologiques soit 45,4 % des demandes** (51,5 % en 2014 et 54 % en 2013). Les atteintes articulaires arrivent en deuxième position avec 9,9 % (9 % en 2014 et 16,9 % en 2013) suivies par les atteintes cutanées avec 6,9 % (7,8 % en 2014 et 15 % en 2013).

Les atteintes cutanées regroupent les **suspensions** d'érythèmes migrants (61,8 %), de lymphocytomes cutanés bénins (3,6 %) et d'acrodermatites chroniques atrophiantes (9,1 %). Cependant, 25,5 % des cas déclarés comme atteintes cutanées correspondent à des symptômes variés (lésions papuleuses, lésions érythémateuses non migrantes, adénopathies) ou non renseignés.

Les autres types d'atteintes (cardiaques, oculaires) sont plus rares (4,8 %).

Il est à noter que 16 % des patients pour lesquels un prélèvement a été adressé au CNR, présentent au moins deux atteintes simultanées (2 % en 2014 et 16 % en 2013). Chez ces patients, on rencontre le plus souvent l'association entre atteinte neurologique et articulaire (46,9 %) et l'association entre atteinte neurologique et cutanée (34,6 %). Parmi les cas déclarés, 13,8 % rapportent simultanément des atteintes neurologiques, cutanées et articulaires.

En 2015, on observe que 24,5 % des cas adressés au CNR sont « hors critères EUCALB ». Chez la plupart de ces patients « hors critères EUCALB », une borreliose a été suspectée face à des symptômes peu ou non spécifiques (algies, asthénie, fièvre, vertiges, troubles mnésiques, lésions cutanées atypiques, etc) voire inappropriés (anémie, cancer, douleurs dentaires, vomissements, etc.).

Au total, parmi les données analysées en 2015, 74 patients soit 9,4 % seulement (contre 13,3 % en 2014 et 18,7 % en 2013) présentaient un diagnostic certain d'infection à *Borrelia*, toutes manifestations cliniques confondues, selon la définition des cas de l'EUCALB (annexe 2).

Parmi ces diagnostics certains, on note :

- 33 cas de neuroborrelioses (NB) - (44,6 %)
- 21 cas d'érythèmes migrants (EM) - (28,4 %)
- 11 cas d'arthrites de Lyme (AL) - (14,9 %)
- 6 cas d'acrodermatite chronique atrophiquante (ACA) - (8,1 %)
- 2 cas d'atteintes oculaires dues à *Borrelia* - (2,7 %)
- 1 cas d'atteintes cardiaques dues à *Borrelia* - (1,4 %).

Le taux de 44,6 % de **neuroborrelioses** (NB) est cohérent avec la littérature indiquant que les NB sont les manifestations disséminées les plus fréquentes en Europe. Ce taux est en augmentation par rapport à 2014 (37 % en 2014).

Le taux de 28,4 % d'**érythème migrant** a diminué par rapport aux années précédentes (EM 30,9 % en 2014 et 49,5 % en 2013). Il est logique que le taux d'érythème migrant recensé par le CNR soit inférieur au taux de NB car le diagnostic des EM est d'une part essentiellement clinique et d'autre part le plus souvent typique.

Le taux d'**arthrites de Lyme** recensé au CNR est de 14,9 % en 2015, ce taux a légèrement diminué par rapport à 2014 (22,2 % en 2014).

Les différents facteurs de risque des patients présentant un diagnostic de Lyme certain, recensés en 2015, ont été évalués. Parmi ces patients, 33,8 % n'ont pas renseigné s'ils étaient exposés à un facteur de risque ou non. Cependant, le profil des patients en fonction de leurs facteurs de risques est semblable depuis 2012.

En étudiant les fiches où ces facteurs sont renseignés, on note de façon logique que le risque de présenter une atteinte à *Borrelia* est plus important en pratiquant une activité de loisir en pleine nature (61,2 %) qu'en étant en contact avec des animaux (30,6 %) ; 18,4 % déclarent être exposés à ces deux facteurs de risques.

Face à ces observations, l'activité d'information du CNR reste primordiale afin de sensibiliser les prescripteurs à la définition des cas de l'EUCALB et à l'intérêt d'un remplissage correct des fiches de renseignements pour pouvoir analyser les tendances.

2.3.1.2 Participation au réseau Sentinelles de surveillance de la borréliose de Lyme

Cette étude prospective porte sur la borréliose de Lyme et repose sur le réseau des médecins généralistes sentinelles. Elle est coordonnée par l'UMR-S 1136.

Ses objectifs sont de décrire les caractéristiques des cas recensés afin d'améliorer leur prévention et leur traitement, d'estimer l'incidence de ces pathologies et de comparer cette incidence à celle observée lors du précédent réseau de 2003-2004.

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

En 2015, le réseau Sentinelles a publié dans Eurosurveillance, l'incidence annuelle de la borréliose de Lyme estimée au niveau national à 51 cas/100 000 habitants avec de fortes disparités régionales (>150 cas/100 000 habitants en Limousin et en Alsace) et une répartition bimodale (5-10 ans et 50-70 ans). Les érythèmes migrants représentent plus de 93% des manifestations déclarées par le réseau. Son évolution est stable depuis 2009.

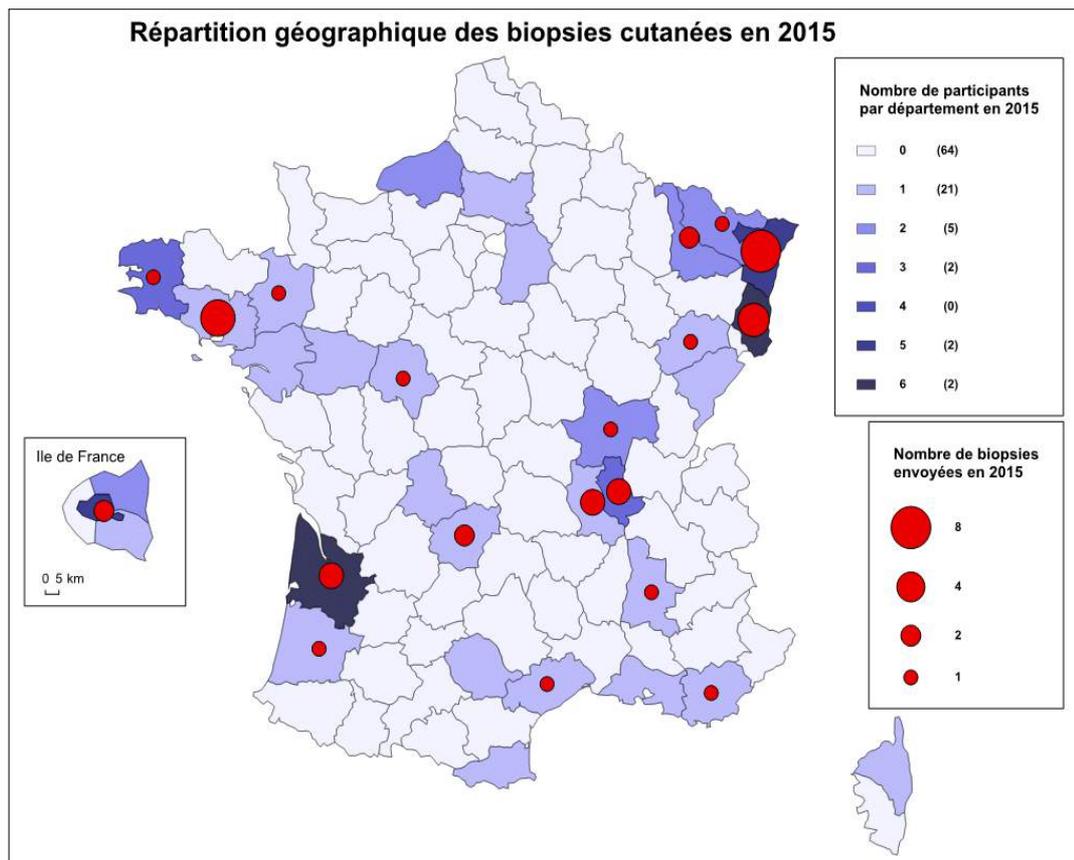
2.3.1.3 Surveillance des manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France

« Protocole biopsies cutanées » ou Etude de la diversité des espèces de *Borrelia* dans les manifestations cutanées de la borréliose de Lyme en France :

Durant ce mandat, nous avons poursuivi l'analyse prospective de biopsies cutanées de patients présentant des lésions typiques ou atypiques d'une suspicion d'infection cutanée à *Borrelia*. Ces prélèvements nous ont été adressés de toute la France essentiellement par des dermatologues volontaires pour participer à ce réseau mais également par quelques infectiologues et internistes.

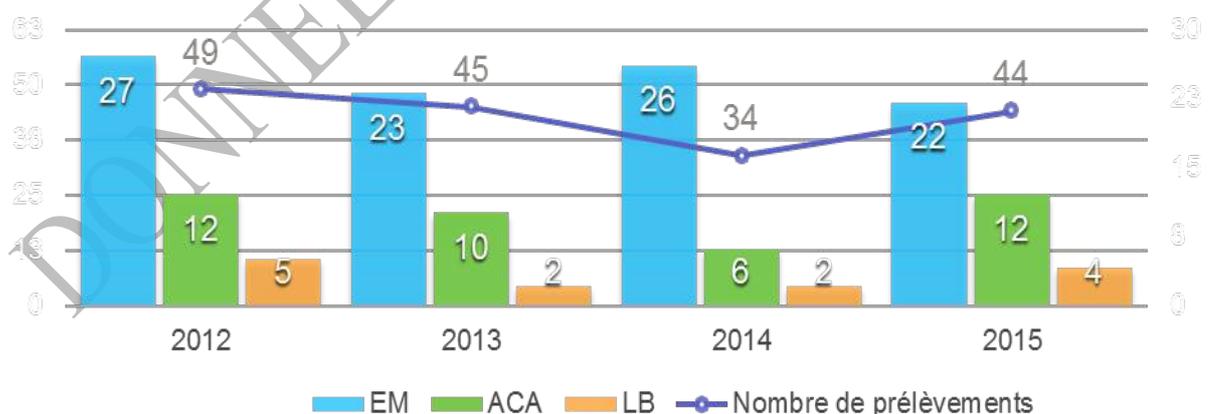
Tous les prélèvements viennent d'adultes nés entre 1931 et 1991, et sont conformes au protocole accepté par le CPP. Le financement des réactifs et consommables de ce protocole est assuré par une bourse de la Société Française de Dermatologie. Les analyses sont effectuées par le personnel du CNR *Borrelia*.

Pendant l'année 2015, nous avons ainsi reçu 44 prélèvements. Ces biopsies nous ont été adressées par 27 participants de départements différents répartis sur l'ensemble du territoire (cf carte ci-dessous).



Parmi les participants, 19 nous ont adressé 1 biopsie cutanée et 8 participants nous ont adressé de 2 à 6 biopsies dans l'année.

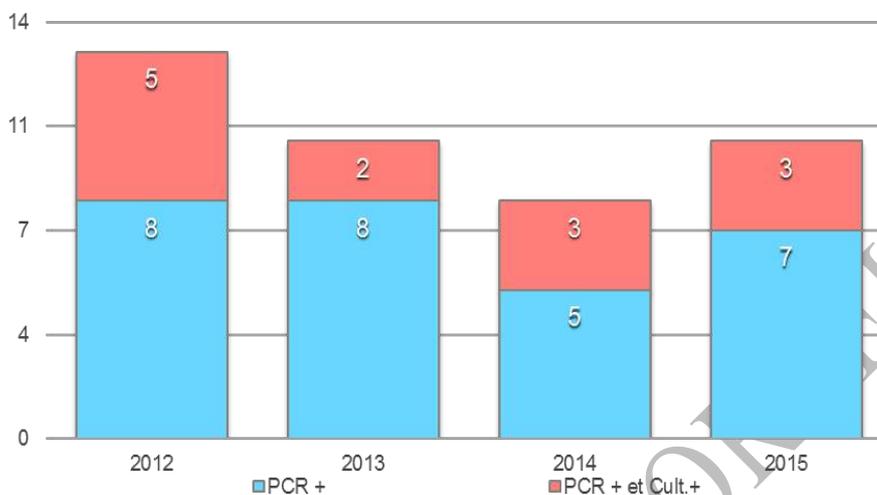
Durant les 4 premières années de ce mandat, nous avons reçu au total 172 biopsies cutanées, prélevées de diverses lésions cutanées : 98 EM, 40 ACA et 13 LB (lymphocytome borrélien) (cf graphique ci-dessous).



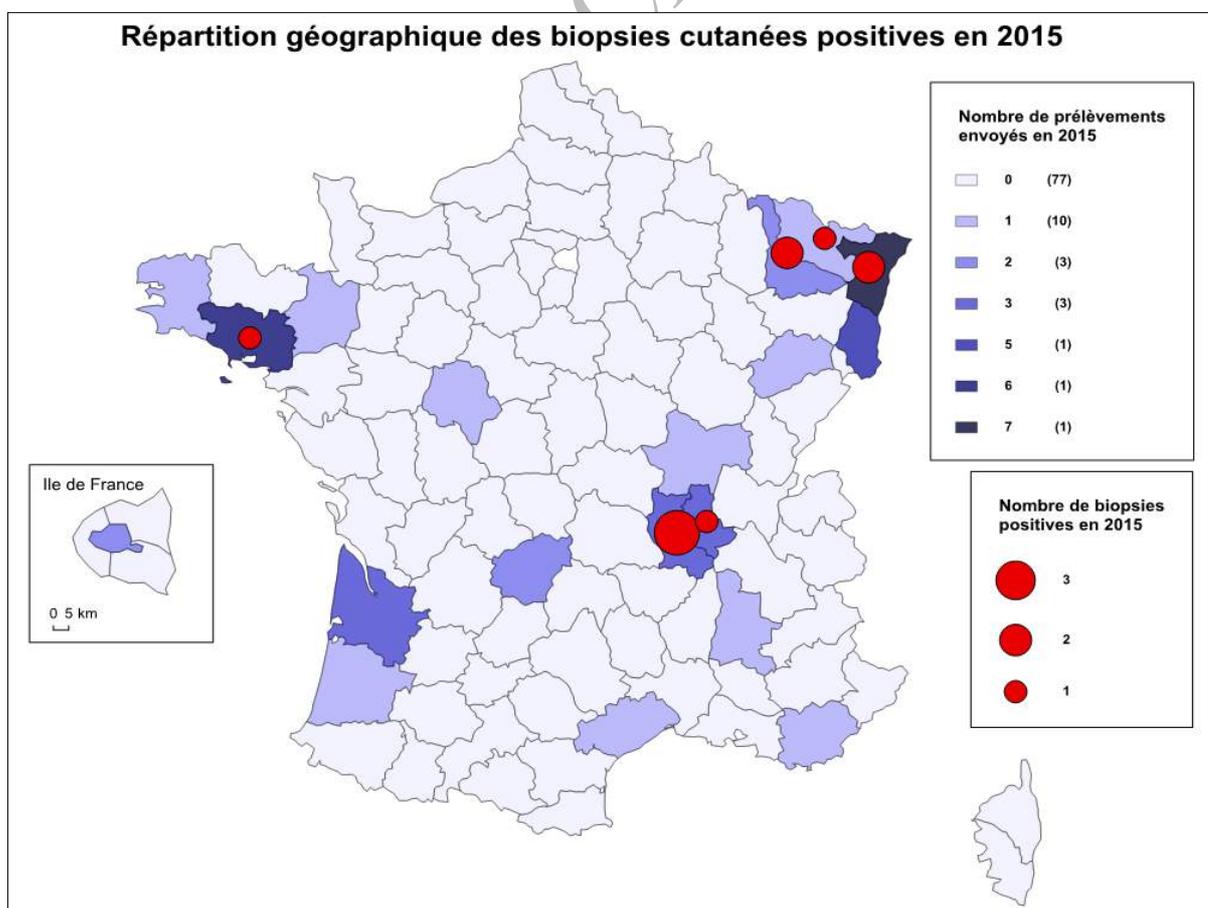
En 2015, parmi les 44 prélèvements qui nous ont été adressés, 22 (50 %) l'ont été pour suspicion d'EM, 12 (27,3 %) pour suspicion d'ACA et 4 (9,1 %) pour suspicion de lymphocytome cutané bénin. Dans 4 cas (9,1 %) les lésions étaient très atypiques (suspicion de morphée ou présence de plaque indurée avec infiltration lymphocytaire).

Proportions de prélèvements (PCR et culture) négatifs et positifs

Durant les 4 premières années de ce mandat, 41 des 172 (soit 24 %) des prélèvements analysés étaient positifs en PCR et certains en culture également cf graphe ci-dessous).



Parmi les 44 prélèvements reçus en 2015, 10 (22,7 %) étaient positifs par PCR dont 3 cas (6,8 %) positifs également par culture. La détection par PCR spécifique est de sensibilité supérieure à la culture malgré l'envoi systématique des biopsies en milieu de transport fourni par le CNR.



Les échantillons positifs venaient plus fréquemment du Nord de la France (Morbihan, Bas-Rhin, Moselle, Meurthe-et-Moselle, Loire et Rhône).

Analyse des suspicions d'EM (n= 22)

Une notion de piqure de tiques est rapportée dans 9 cas (40,1 %) avec une date précisée dans 7 cas (31,8 %). La durée d'attachement de la tique (de moins de 24 h à plus de 24h) est mentionnée dans 3 cas (13,6 %).

La localisation de la lésion était précisée dans 90,9 % des cas avec une prédominance sur les membres inférieurs (55 %).

Il s'agissait majoritairement de lésion unique : 19 cas (86,4 %), alors que des localisations multiples (EEM) étaient présentes dans 3 cas (13,6 %). Cette répartition est quasiment identique à celle observée depuis 2012.

Parmi les lésions uniques, 10 lésions (52,6 %) étaient à centre clair et 7 lésions (36,8 %) étaient homogènes (2 cas non renseignés). Parmi les 3 EEM, 2 étaient à centre clair (66,7 %) et 1 à centre homogène (33,3 %). Ces proportions sont similaires à celles des années précédentes.

Le diamètre de la lésion au moment du diagnostic variait de façon importante, de 5 cm à 44 cm. La répartition montre que 11 des 22 lésions étaient inférieures ou égales à 15 cm (50 %).

Le délai d'apparition des lésions était rapporté dans 5 cas seulement (22,7 %) et il variait de 5 à 40 jours. L'EM est une lésion indolore, le diagnostic est souvent tardif et le délai d'apparition inconnu.

La durée rapportée de l'EM au moment de la consultation variait de 1 à 120 jours.

Les signes associés étaient signalés dans 54,6 % (12 cas) : un prurit était rapporté dans 7 cas (31,8 %), des sensations de brûlures dans 7 cas (31,8 %), des douleurs dans 2 cas (9,1 %) et des paresthésies dans 3 cas (13,6 %). Dans 5 cas (22,7 %), plusieurs signes étaient associés.

Une antibiothérapie préalable au prélèvement avait déjà été mise en route dans 2 cas (9,1 %) : les biopsies étaient alors négatives par culture et par PCR dans 100 % des cas.

Après prélèvement et sans attendre le retour d'analyses, 17 des 22 suspicions d'EM (77,3 %) ont bénéficié d'une antibiothérapie : 9 cas ont été traités par amoxicilline (52,9 %), 8 cas par doxycycline (47,1 %), 5 non pas été traités suite au prélèvement (29,4 %).

Parmi les 6 biopsies cutanées d'EM positives en culture ou PCR en 2015, toutes provenaient de patient n'ayant pas reçu d'antibiothérapie préalable et présentant des lésions uniques. Ces lésions étaient présentes chez des patients en contact régulier avec la nature (83,3 %), notamment pour loisirs. Elles présentaient un centre clair dans 50 % des cas renseignés. Dans tous les cas, le diamètre était compris entre 17 cm et 30 cm et une durée moyenne d'évolution de 5 semaines (de 21 jours à 90 jours). Aucun de ces cas n'était associé à des arthralgies et un seul était associé avec des paresthésies. Au plan bactériologique toutes étaient positives en PCR et 3 (50 %) étaient aussi positives en culture. L'espèce responsable de ces infections était pour tous les EM *B. afzelii*. Dans un seul cas, un traitement antibiotique n'avait pas été mis en place après prélèvement, les autres EM positifs avaient été traités : 4 par amoxicilline (80 %), 1 par doxycycline (20 %).

Analyse des suspicions d'acrodermatite chronique atrophiante (n = 12)

En 2015, 12 des 44 (27,3 %) prélèvements reçus étaient des suspicions d'ACA. Elles étaient associées à des manifestations neurologiques dans 3 cas (25 %) dont une paralysie faciale. Dans 5 cas (41,7 %), les lésions avaient des localisations multiples, 8 cas (66,7 %) présentaient des lésions sur les membres inférieurs et 1 cas (8,3 %) au niveau des membres supérieurs (3 cas non renseignés).

Parmi les suspicions d'ACA, 4 étaient positives en PCR mais négatives en culture. L'espèce responsable de ces infections était pour ces 4 ACA *B. afzelii*.

Parmi les 4 ACA positives, toutes provenaient de patient n'ayant pas reçu d'antibiothérapie préalable. La durée d'évolution de l'ACA au moment de la biopsie variait de 6 mois à 4 ans.

Dans un cas, une polyneuropathie était associée.

Après biopsie, 6 cas (50 %), dont 1 des 4 positifs, avaient été traités selon les recommandations européennes par cyclines (doxycycline) ; trois cas (25 %) avait été traités par céftriaxone, dont 2 des 4 positifs, ce qui ne correspond pas aux recommandations européennes. Dans 3 cas (25 %), la prise en charge thérapeutique n'est pas renseignée.

Ce protocole national a permis depuis sa mise en place, d'étudier en collaboration avec les dermatologues du CHU de Strasbourg, la diversité en France des présentations cliniques et histologiques des ACA. Tous les cas positifs en PCR et/ou en culture ont été analysés. Le diagnostic clinique a été confirmé et les données sérologiques analysées.

Au total, 22 patients ont été inclus. Tous avaient une sérologie positive. A côté de la présentation clinique et histopathologique habituelle, des aspects cliniques atypiques ont été mises en évidence chez 2 patients ainsi que des aspects histopathologiques atypiques dans 6 cas.

Ce travail a été accepté pour publication dans J Am Acad of Dermatology (Lenormand C. et coll).

Analyse des suspicions de lymphocytome borrélien (n = 4)

En 2015, 4 prélèvements sur 44 (9,1 %) étaient des suspicions de lymphocytome borrélien. Les localisations de la lésion étaient selon les cas : la tempe, l'avant-bras, l'épaule et un cas présentait des lésions multiples. Leur durée d'évolution allait de 18 mois à 28 ans. Un cas était associé à des signes neurologiques.

La moitié des cas avaient bénéficié d'un traitement antibiotique préalable. Tous les prélèvements se sont relevés négatifs en PCR et en culture.

Après prélèvement, les deux cas n'ayant pas eu de traitement antibiotique préalable ont bénéficié d'une antibiothérapie par amoxicilline dans un cas et doxycycline dans l'autre cas.

Espèces de Borreliella détectées dans les prélèvements cutanées (2009-2015)

La répartition des espèces identifiées au sein des prélèvements positifs (cf tableau ci-dessous) confirme la présence en France des trois espèces de *Borreliella* les plus fréquemment incriminées dans les borrélioses de Lyme en Europe, avec une nette prédominance de l'espèce *B. afzelii*.

<i>Espèces de Borreliella</i>	2012	2013	2014	2015
<i>B. afzelii</i>	12	8	5	10
<i>B. garinii</i>	0	2	1	0
<i>B. burgdorferi</i>	1	0	1	0
<i>Borreliella non typables</i>	0	0	1	0

2.3.1.4 Participation à la surveillance de 3 maladies transmises par les tiques en Alsace – Réseau Alsacétiques

Durant la mandature du CNR, un réseau piloté par la CIRE (cellule inter-régionale d'épidémiologie) Nord-Est a mis en place une étude épidémiologique « Alsacétiques ». Cette étude prospective porte sur 3 maladies transmises par les tiques : la borréliose de Lyme, l'encéphalite à tiques (TBEV) et l'anaplasmose granulocytaire humaine. Cette étude s'est déroulée du 1^{er} janvier 2014 au 31 décembre 2015.

Ses objectifs sont de décrire les caractéristiques des cas recensés afin d'améliorer leur prévention et leur traitement, d'estimer l'incidence de ces pathologies et de comparer cette incidence à celle observée lors du précédent réseau de 2003-2004.

Ce signalement est effectué à l'aide d'un questionnaire individuel court, pouvant être complété en ligne *via* le portail virtuel voozanoo® dédié mis en place par la CIRE Nord-Est ou sur papier.

Au total, 388 médecins libéraux et hospitaliers ont participé à l'étude, généralistes et autres spécialités, représentant 11 % des médecins en activité en Alsace. Quasiment tous les cantons étaient couverts.

Préalablement à l'étude, des soirées de formation ont été organisées sur l'Alsace, animées par un binôme CNR – Infectiologue.

Durant les deux années de l'étude, un comité de pilotage, dont fait partie le CNR *Borrelia* et l'ARS Alsace, s'est réuni 2 fois par an pour valider les cas déclarés par les médecins selon des critères de définition de cas définis au préalable sur la base des référentiels européens, définissant des cas certains et des cas probables.

Au total, ont été retenus :

- plus de 670 cas de borréliose de Lyme
- 14 d'infections à TBE
- 3 cas d'anaplasmose granulocytaire

L'analyse épidémiologique est en cours et est réalisée par la CIRE Nord-Est. Un des objectifs de ce travail est d'évaluer l'incidence régionale de la borréliose de Lyme par rapport à une étude épidémiologique humaine précédente réalisée en 2003- 2004. Une corrélation avec les données vectorielles du CNR sera aussi réalisée.

2.3.2 Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus*

La surveillance entomologique d'*Ixodes ricinus* a été réalisée pendant cette mandature en Alsace principalement. En effet, cette région géographique est un modèle pour l'épidémiologie vectorielle car elle demeure une région de forte densité en tiques et pour le risque acarologique. Ceci est lié à son écosystème forestier, notamment à sa forte densité en grands gibiers (suidés et cervidés).

D'autre part, l'Alsace a été particulièrement étudiée car elle avait fait l'objet en 2003 et 2004 d'une étude sur l'épidémiologie vectorielle, qui avait fait suite à une étude en épidémiologie humaine. Nous avons voulu étudier dans le temps de cette mandature si des modifications de cette épidémiologie vectorielle étaient apparues 10 ans après.

Par ailleurs, La CIRE (cellule inter-régionale d'épidémiologie) Grand-Est ayant décidé en 2014-2015 une nouvelle étude épidémiologique humaine sur les cas de borréliose, d'anaplasmose et d'encéphalite à tique, il nous a semblé essentiel de suivre en parallèle sur plusieurs années la population de tiques et d'essayer de corrélérer la densité en tique, le risque acarologique et les cas humains pour ces trois pathologies (études en cours d'analyse).

Par rapport au projet rédigé en 2011, nous avons atteint et dépassé un certain nombre des objectifs fixés. Nous avons étudiés plus de sites que ceux initialement proposés pour la région Alsace. En effet, afin de mieux mesurer une évolution potentielle entre l'étude d'épidémiologie vectorielle de 2003-2004 et celle de 2013-2014, il nous a semblé important de reprendre tous les sites étudiés il y a 10 ans. Cette étude nous a permis de conclure qu'aucune augmentation significative en densité de tiques et en risque acarologique n'a été observé sur une période de 10 ans. Pour ces différents sites, un inventaire de la végétation a aussi été réalisé et l'impact éventuel sur les tiques est en cours d'analyse.

Par ailleurs, nous avons commencé en 2015, à explorer l'épidémiologie vectorielle en Bretagne qui est différente de l'Alsace tant par sa situation géographique que par son climat et ses écosystèmes. Le nombre de sites analysés en Alsace ayant été réduit, ce travail sera possible sur 2016.

2.3.2.1 Objectifs de la campagne de collecte de 2015

Dans le cadre des missions du CNR *Borrelia*, la surveillance acarologique effectuée en 2015 a eu pour objectifs d'étudier :

- la répartition du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace
- le risque acarologique (taux d'infection des nymphes) en Alsace pour :
 - les espèces de *Borrelia*
 - les espèces de *Borrelia* agents de fièvre récurrente
 - *Anaplasma phagocytophilum*
- la mise en place d'une collaboration avec le Dr Brigitte Degeilh (Université de Rennes). En 2015, nous avons commencé à étudier en parallèle le risque acarologique pour ces mêmes pathogènes dans une autre région de France, la Bretagne, afin d'obtenir des données entomologiques pour l'Ouest de la France où le climat est océanique.
- Le but est de pouvoir comparer les taux dans deux régions du Nord de la France (Est et Ouest), chaque année et de suivre l'évolution de ce risque comparé.

2.3.2.2 Choix des sites et méthode de collecte

En 2015, afin d'étudier la répartition du vecteur *I. ricinus*, nous avons, dans la continuité du travail effectué les années précédentes, collectés sur 4 sites géographiques répartis dans le Bas-Rhin et le Haut-Rhin (voir carte ci-dessous), effectuant 34 collectes sur l'année. Les sites ont été collectés mensuellement d'avril à décembre :

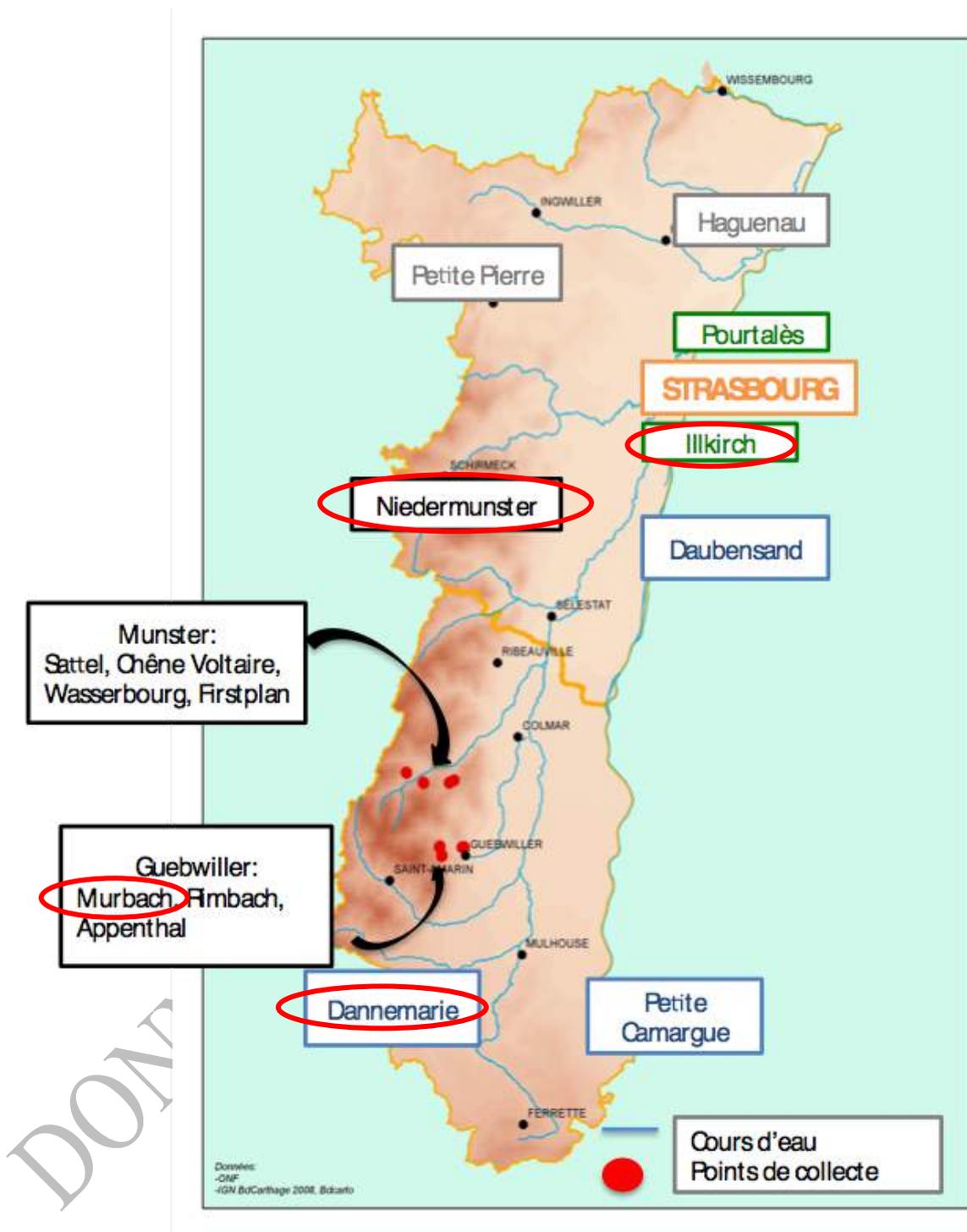
- sites de Niedermunster et d'Illkirch pour le Bas-Rhin
- sites de Murbach et Dannemarie pour le Haut-Rhin.

Ces sites ont été choisis parmi les différents sites étudiés les années précédentes en fonction de leur localisation géographique, de l'activité humaine qui s'y déroule et selon les données bibliographiques, afin de faire un suivi à 10 ans. En effet, l'enquête épidémiologique réalisée en Alsace en 2003 et 2004, avait montré que la vallée de Guebwiller (Murbach) était une zone de forte incidence pour la borréliose de Lyme tandis que le canton de Dannemarie avait une plus faible incidence.

Les sites investigués par le Dr B. Degeilh en Bretagne correspondent aux sites de la Forêt de Rennes et du Bois de Soevre et ont été collectés en 2015 de septembre à novembre.

La méthode de collecte utilisée dans tous les sites a été la même utilisant la technique du drapeau.

**Carte de répartition des principaux sites investigués en Alsace 2012-2015.
Les sites entourés sont ceux qui le sont encore actuellement en 2016**



En vert sont représentés les sites péri-urbains
En bleu les sites de plaines +/- inondables
En noir les zones forestières +/- montagneuses
En gris, les sites collectés uniquement en 2013

2.3.2.3 Résultats de densités en nymphes

La densité en nymphes notée D a été calculée de la façon suivante :

$$D = \sum ni/t$$

n correspond au nombre de nymphes totales prélevées sur le lieu de collecte i, et t : le nombre de tirs effectués.

La densité D est rapportée à une surface de 100 m².

En 2015

Site	Nymphes collectées	Adultes collectés
ALSACE (Avril - Décembre)		
Illkirch	540	19
Niedermunster	376	71
Dannemarie	202	2
Murbach	1040	22
BRETAGNE (Septembre - Novembre)		
Forêt de Rennes	79	5
Bois de Soevre	53	6
Totaux	2290	125

En Alsace, le site ayant la densité en nymphes la plus élevée correspond au site de Murbach et la densité en adultes la plus élevée a été observée à Niedermunster.

En 2015, nous avons commencé, en collaboration avec le Dr. B. Degeilh, à étudier l'Ouest de la France. Les premières données obtenues montrent que la densité en nymphes est moindre que celle de l'Est de la France et que celle des adultes est similaire à celle de l'Est de la France.

Précédemment en 2012, 2013 et 2014, nous avons observé une variation saisonnière (intra-annuelle) de la densité en nymphes. Celle-ci est à nouveau observée en 2015. Cela correspond tout à fait aux données de la littérature avec un pic maximum d'activité d'avril à juin puis un léger pic en automne (Kurtenbach et al. 2006).

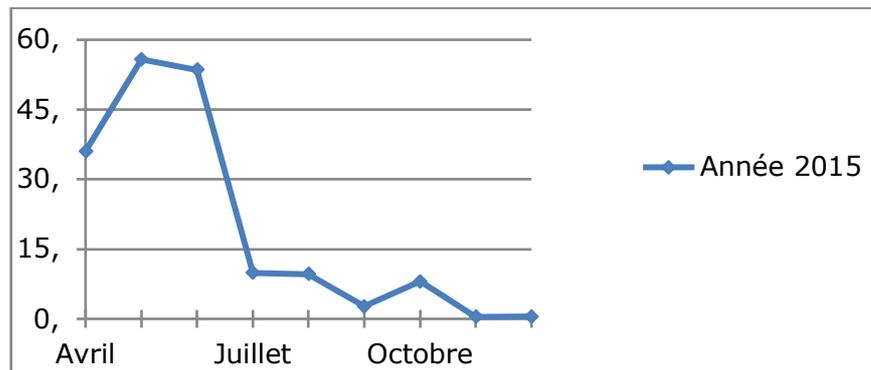
2014

Site	Nymphes collectées	Adultes collectés
Appenthal	1078	163
Chêne Voltaire	274	44
Dannemarie	130	12
Daubensand	151	5
Firstplan	492	25
Illkirch	384	23
Murbach	1231	68
Niedermunster	177	35
Petite Camargue	183	4
Pourtalès	284	14
Rimbach	355	22
Sattel	466	61
Wasserbourg	586	108
Totaux	5791	584

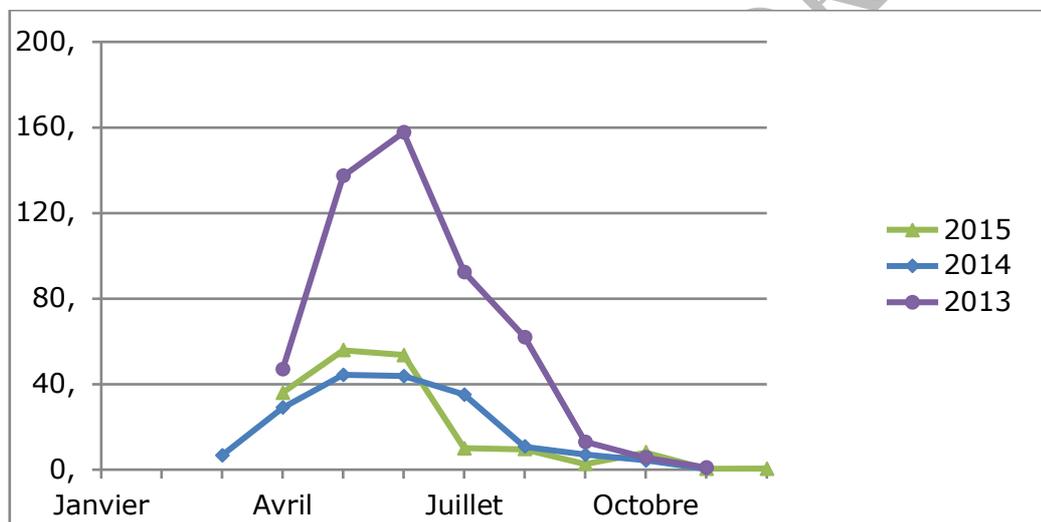
2013

Site	Nymphes collectées	Adultes collectés
Appenthal	1414	126
Chêne Voltaire	231	10
Dannemarie	86	3
Daubensand	18	1
Firstplan	441	16
Illkirch	413	9
Murbach	2166	41
Niedermunster	980	31
Petite Camargue	6	6
Pourtalès	866	15
Rimbach	793	17
Sattel	413	21
Wasserbourg	900	53
Totaux	8727	349

Densités moyennes en Alsace en nymphes selon le mois de collecte en 2015



Densité moyenne en Alsace en nymphes selon le mois de collecte de 2013 à 2015



L'abondance des tiques dans un écosystème est associée à des facteurs abiotiques (température, humidité,...) et des facteurs biotiques (végétation, faune sauvage) (Tagliapietra et al. 2011) (Pfäffle et al. 2013). Sur chaque site lors de collecte, la température au sol est relevée. En 2013 et 2014, nous avons investigué le rôle de certains facteurs abiotiques dont l'humidité relative et biotique comme l'humus. Une publication sur ce sujet est en cours de finalisation. La nature du sol semble importante car elle va en effet permettre à la tique de faire sa diapause hivernale sans trop de problème, surtout si le sol est meuble.

Suite aux données globales obtenues sur les 3 années (graphe ci-dessus), nous avons regardé si les précipitations et les températures avaient variées fortement entre 2013 et les 2 années suivantes, sachant que ce sont deux facteurs qui peuvent contribuer fortement à augmenter ou diminuer la population de tiques *Ixodes*.

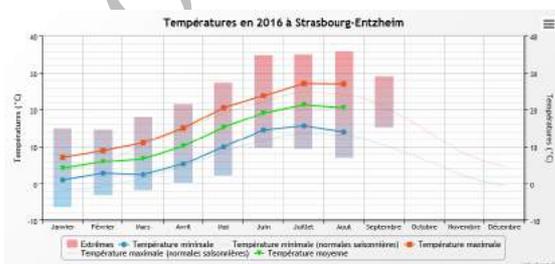
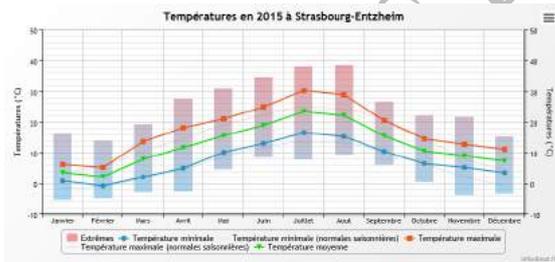
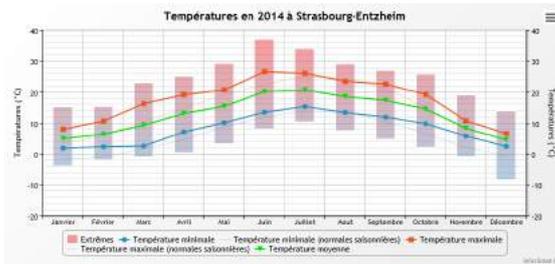
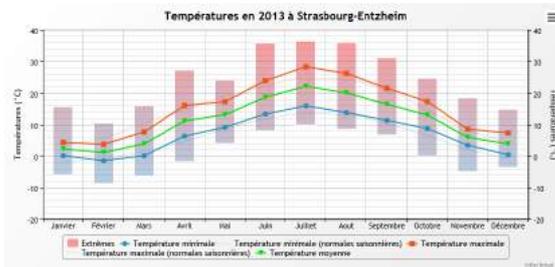
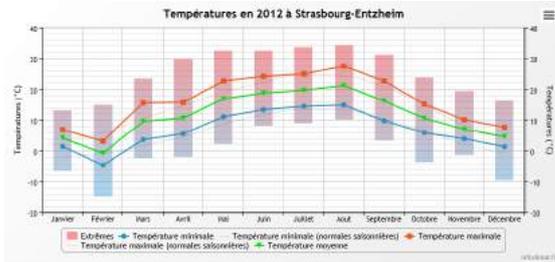
Nous nous sommes basés sur les données des deux stations météo de la plaine d'Alsace située dans le Bas-Rhin (Strasbourg-Entzheim) et Haut-Rhin (Bâle-Mulhouse) disponibles sur le site infoclimat :

<http://www.infoclimat.fr/climatologie/annee/2012/strasbourg-entzheim/valeurs/07190.html>

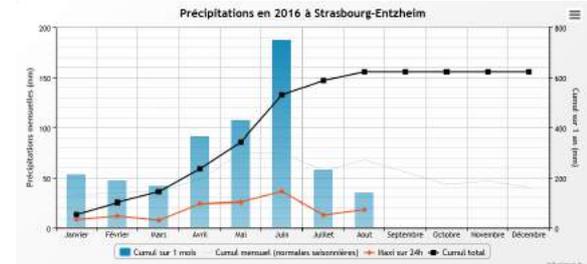
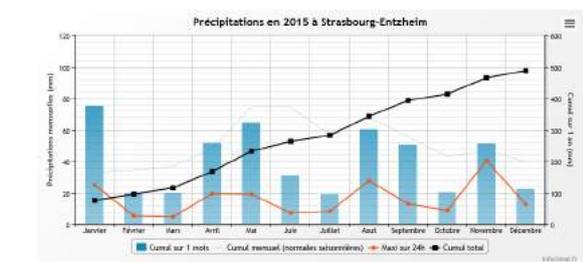
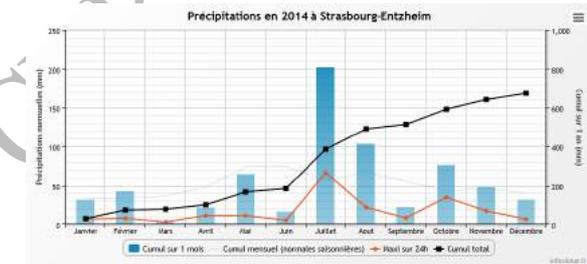
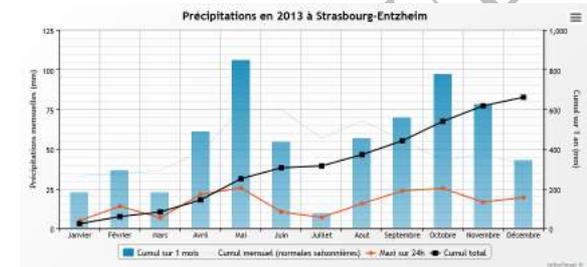
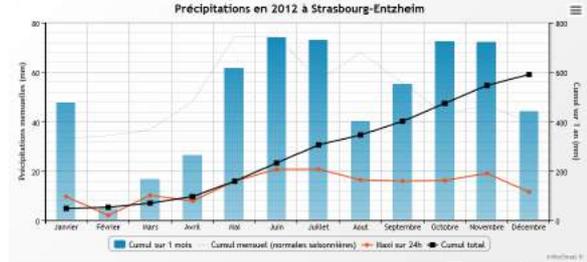
Les données de la station météo d'Entzheim-Strasbourg sont présentées à titre d'exemple ; celles de Bâle-Mulhouse sont identiques et non présentées.

Site de Strasbourg-Entzheim (Bas-Rhin)

TEMPERATURES



PRECIPITATIONS



L'analyse des données météo montre qu'il n'y a pas eu de différence marquée en termes de basses ou de très hautes températures quelle que soit la station, de même en termes de précipitations, notamment pour l'année 2013. On peut seulement noter en 2013 par rapport aux

années suivantes, un pic de précipitations au moment du pic de densité en tiques au printemps dans l'environnement. La densité en tiques étant associée à différents facteurs biotiques et abiotiques, des facteurs autres que les données climatiques ont probablement marqué l'année de collecte 2013.

2.3.2.4 Taux d'infection des nymphes en Alsace en 2015

En 2015, 1 088 nymphes ont été analysées par PCR pour la présence de *Borrelia*. Ces nymphes sont issues des collectes de l'année 2015, effectuées sur 4 sites, de façon mensuelle (d'avril à décembre) en Alsace et de 2 sites échantillonnés mensuellement de septembre à novembre en Bretagne. Parmi les nymphes analysées, 142 sont positives pour *Borrelia*.

Taux d'infection globale des nymphes :

2015

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage d'infection	IC ₉₅
ALSACE				
Illkirch	276	34	12,3	[8,7 – 16,8]
Niedermunster	207	23	11,1	[7,2 - 16,2]
Dannemarie	192	20	10,4	[6,5 – 15,6]
Murbach	299	57	19,1	[14,8 – 24,0]
BRETAGNE				
Forêt de Rennes	79	1	1,3	[0,03 – 6,9]
Bois de Soevre	53	7	13,2	[5,5 – 25,3]

2014

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage d'infection	IC ₉₅
Alsace (total)	3034	233	7,7	[6,8; 8,7]
Bas-Rhin	770	62	8,1	[6,3 ; 10,2]
Haut-Rhin	2264	171	7,6	[6,5; 8,7]

Au total, sur les 4 années de la mandature du CNR, le pourcentage de tiques infectées varie, selon les sites et les années mais reste dans les mêmes tendances :

- Murbach, dans la vallée de Guebwiller, demeure une zone de forte densité en nymphes avec un taux de positivité élevé.

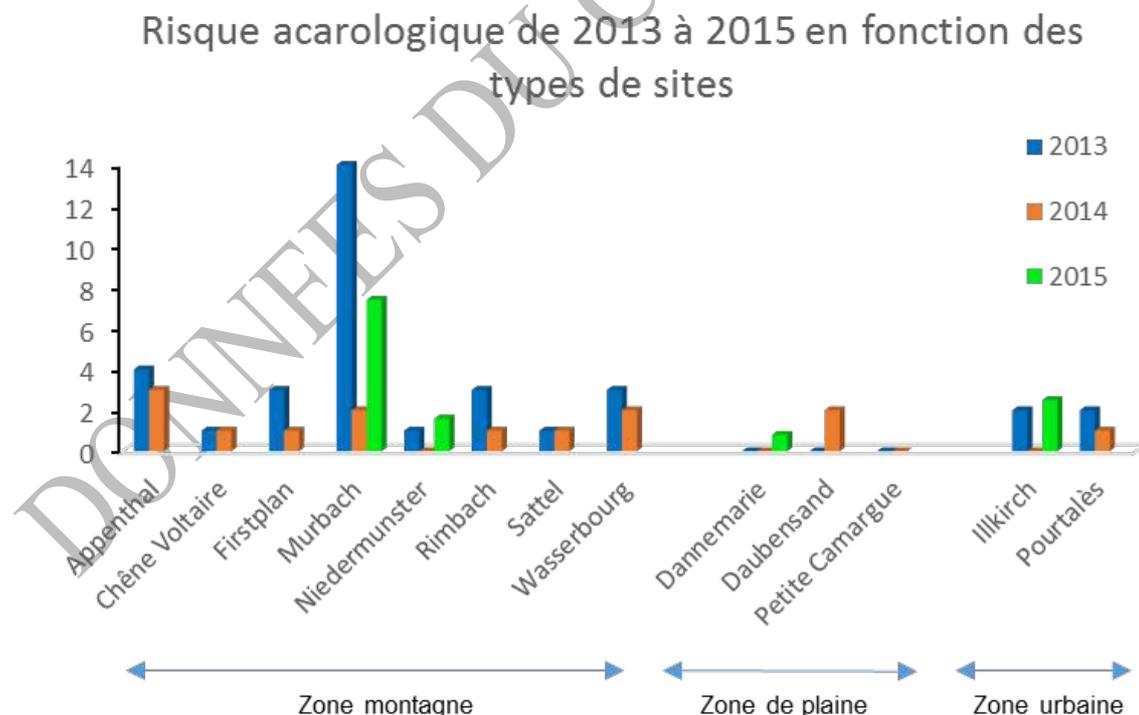
- Les zones périurbaines, Illkirch et Pourtalès autour de Strasbourg, sont des zones à risque de borréliose de Lyme au même titre que les zones de moyenne montagne comme Niedermunster.
- Dannemarie demeure une zone de faible densité avec les taux d'infection les plus bas en Alsace.
- En 2015, les taux d'infection semblent plus élevés, nous n'avons pas de recul pour l'instant pour conclure à une tendance à l'augmentation ou si cela n'est que ponctuel. Un suivi permettra de confirmer ou infirmer ces tendances.

De façon intéressante, un des deux sites investigués en Bretagne à un taux aussi élevé que certains sites en Alsace. Là aussi, un suivi sera utile pour confirmer ou infirmer ces tendances.

2.3.2.5 Densité en nymphes infectées/100 m² durant la mandature

Le risque acarologique combine la densité en tiques et leur taux d'infection. Il se définit en fonction de la densité de tiques infectées/100m² qui pourraient transmettre un agent infectieux à la population.

Les graphiques suivants synthétisent les données sur la densité en nymphe, la prévalence de l'infection à *Borrelia* chez les nymphes et la densité en nymphes infectées, durant 3 années de la mandature.



En conclusion, sur la période 2013 à 2015, les zones de montagne constituent l'écosystème le plus favorable pour les tiques. On y trouve donc le risque acarologique le plus important. Murbach demeure un site à investiguer tant en termes de facteurs abiotiques qu'en termes de facteurs biotiques. C'est une vallée vosgienne très encaissée, avec une activité humaine

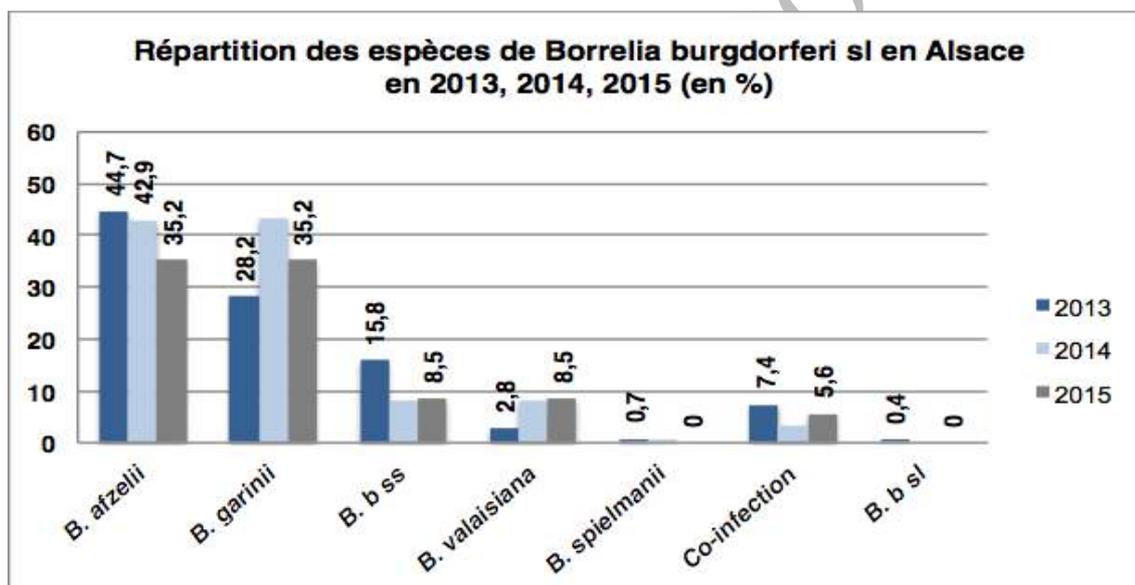
importante (abbaye de Murbach très visitée avec son village). Les zones de plaine sont nettement moins à risque. Par contre, les zones périurbaines autour de Strasbourg (Illkirch et Pourtalés) présentent un risque acarologique significatif, à ne pas négliger. L'information du grand public doit être également dirigée vers cette population.

2.3.2.6 Répartition des espèces de *Borrelia* dans les nymphes collectées durant la mandature

En 2015, parmi les 1 088 nymphes analysées, 142 sont positives à *Borrelia* (anciennement *B. burgdorferi* sl)

Afin de savoir par quelle(s) espèce(s) de *Borrelia* ces nymphes sont infectées, nous avons réalisé le typage des espèces par biologie moléculaire.

Evolution de la répartition des espèces de *Borrelia* dans les tiques de 2013 à 2015 :



Au cours des différentes années étudiées, sur les différents sites de collecte en Alsace, le CNR a mis en évidence dans les tiques les espèces *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* et *B. valaisiana*.

Alors que nous avons détecté les années précédentes de rares tiques infectées par *B. spielmanii*, aucune tique n'a été détectée positive pour cette espèce en 2015.

En parallèle, aucun cas humain à *B. spielmanii* n'a été diagnostiqué sur l'ensemble de la mandature.

Les deux espèces les plus fréquentes sont *B. afzelii* et *B. garinii*, les autres espèces, dont *B. burgdorferi* sont en proportion moins importantes. La répartition des espèces de *Borrelia* de façon globale montre une nette prépondérance de tiques infectées par *B. afzelii* dont le réservoir principal est les rongeurs et de *B. garinii* dont le réservoir est les oiseaux (Humair and

Gern 2000). Cela correspond à la situation en pathologie humaine c'est en majorité *B. afzelii* qui est mis en évidence dans les cas humains de borréliose de Lyme, et ce sur l'ensemble du territoire (cf 3.3.1. surveillance humaine).

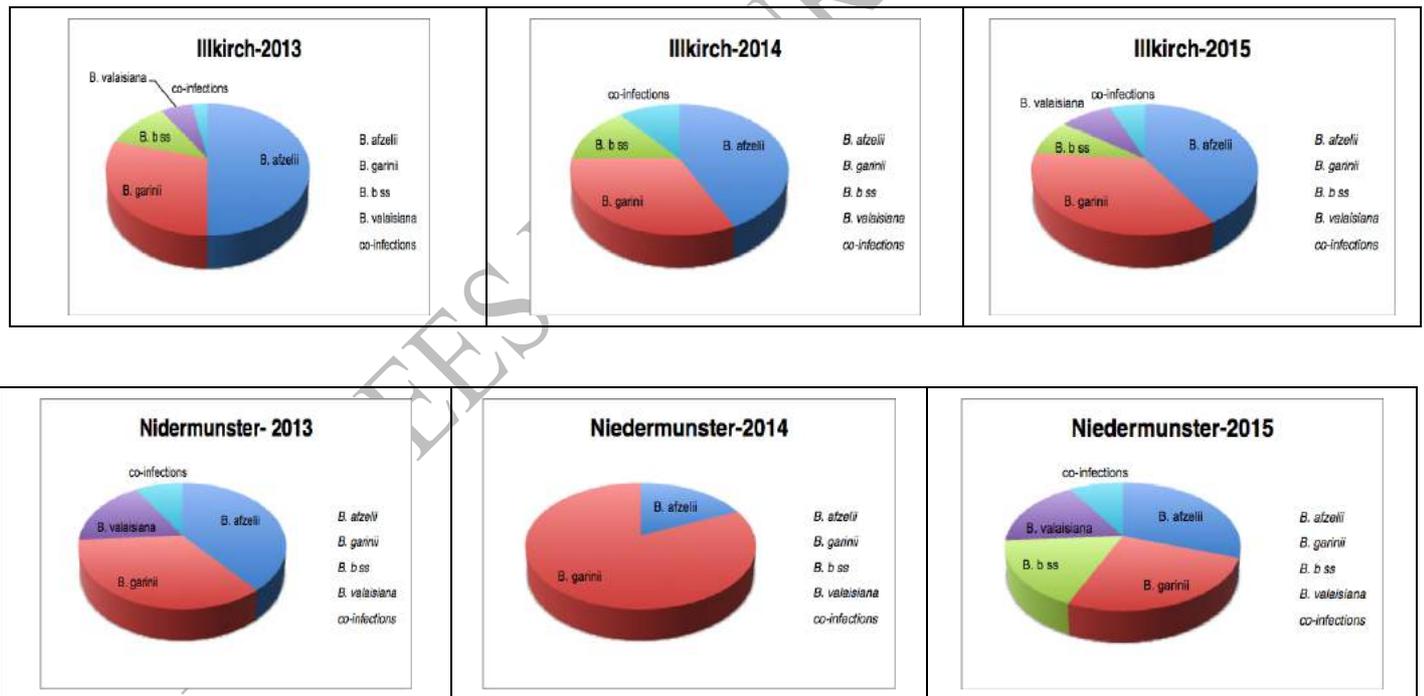
A noter que parmi ces 142 nymphes positives, huit nymphes (6%) présentaient une co-infection à deux espèces de *Borrelia* :

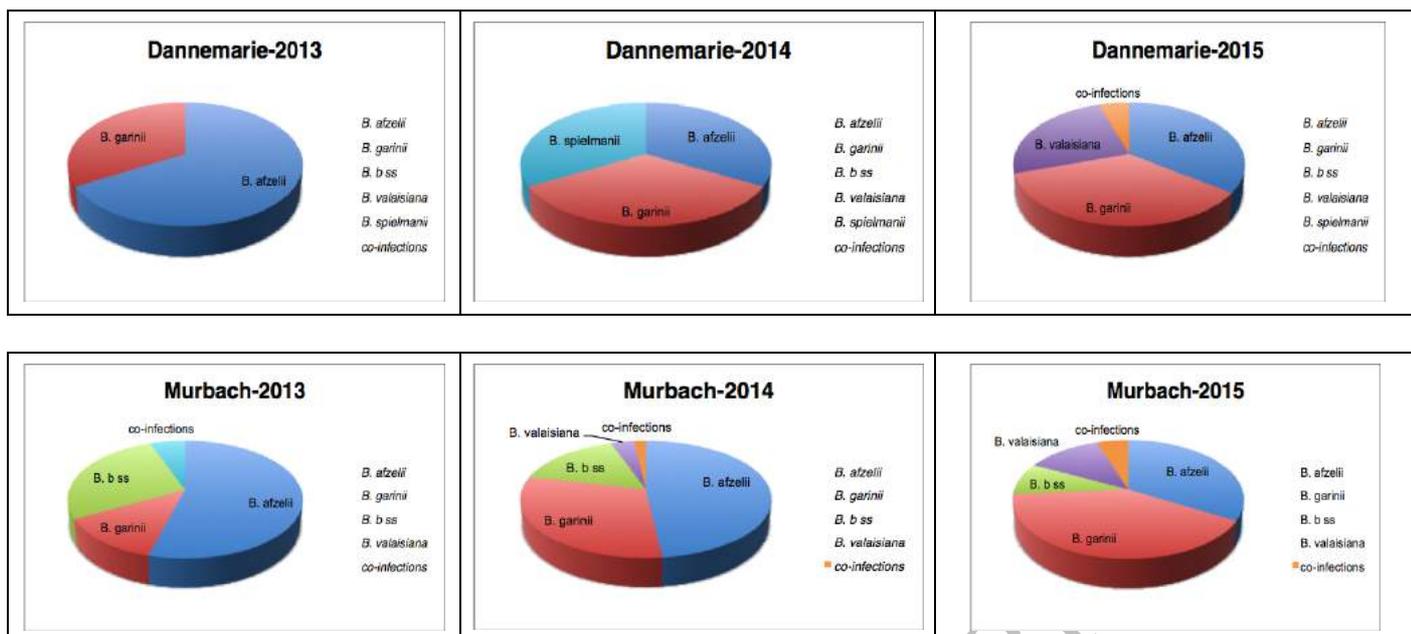
- 6 nymphes positives pour *B. garinii* et *B. valaisiana*
- 2 nymphes positives pour *B. afzelii* et *B. burgdorferi*.

On observe des disparités d'un site géographique à l'autre (graphes ci-dessous), ce qui n'est pas surprenant car les réservoirs animaux varient probablement entre les sites.

Ces variations sont surtout observées entre les sites de montagnes (Niedermunster et Murbach) et les sites urbains ou de plaine (Illkirch et Dannemarie). On note aussi une variation de la répartition des espèces de *Borrelia* à l'intérieur d'un même site, d'une année à l'autre. Cependant, *B. afzelii* et *B. garinii* restent les espèces majoritaires dans tous les sites et ce sont les deux espèces les plus pathogènes et les plus souvent mises en évidence chez l'Homme en Europe (Stanek et al. 2012).

Répartition des différentes espèces de *Borrelia* en fonction des sites de collecte de 2013 à 2015 :





2.3.2.7 Recherche d'autres pathogènes dans les tiques : *Ixodes ricinus*

► *Anaplasma phagocytophilum*

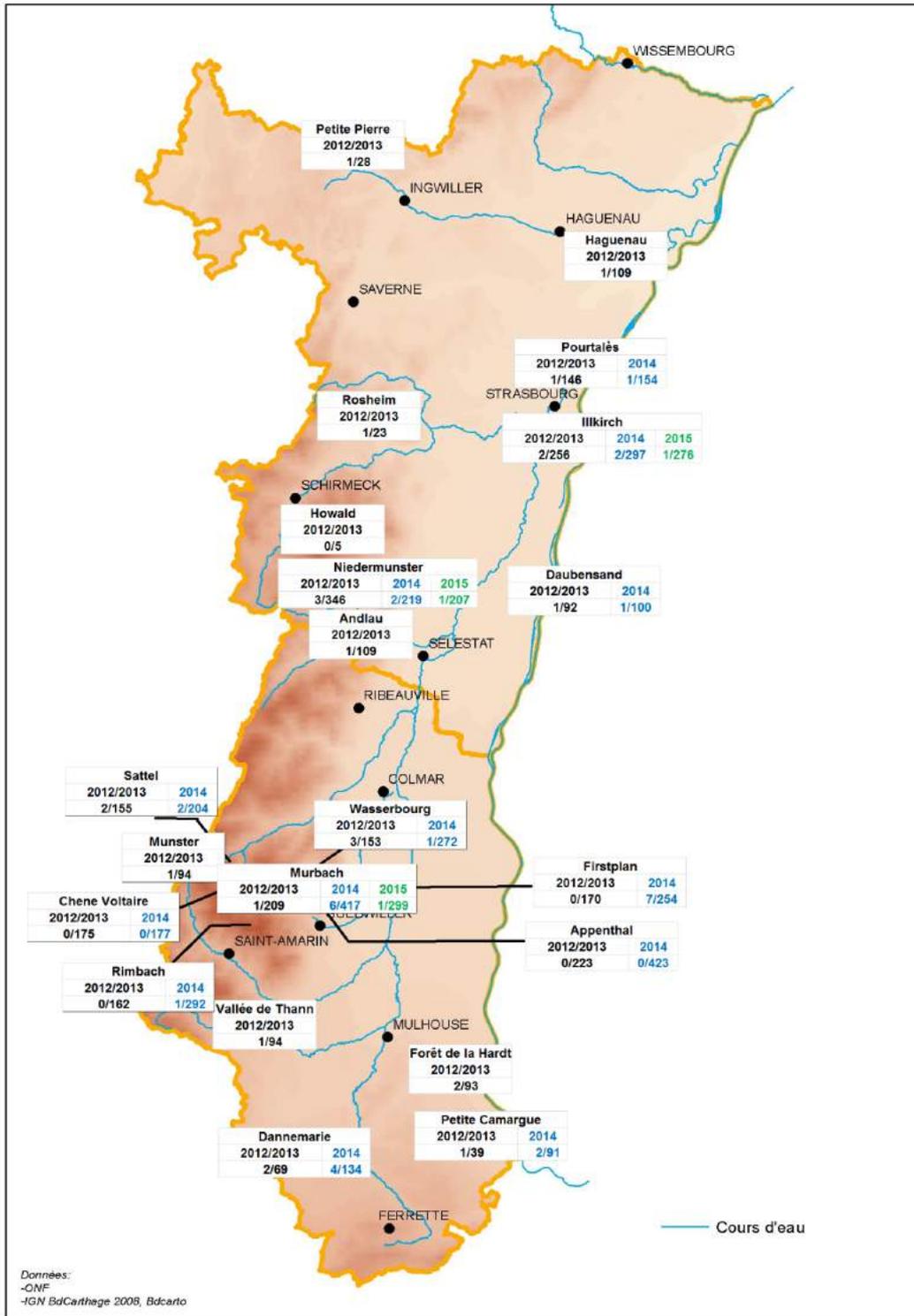
La famille des Anaplasmataceae regroupe les bactéries des genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* et *Wolbachia* qui sont des organismes intracellulaires stricts des cellules eucaryotes. *A. phagocytophilum* se multiplie sous forme de morula dans les globules blancs et est responsable de l'anaplasmose granulocytaire humaine. Cette maladie est cosmopolite puisqu'elle est décrite au niveau animal et humain aussi bien en Europe, qu'en Asie, aux États-Unis ou en Australie (Woldehiwet 2010).

La prévalence de cette bactérie varie fortement d'un pays à l'autre et d'une espèce de tique à l'autre, avec notamment des taux compris entre < 1% et 20 % chez *I. ricinus* en Europe de l'Ouest.

En 2015, 1106 nymphes ont été testées par PCR ciblant le gène *msp2/p44* d'*Anaplasma phagocytophilum*. Ces nymphes sont issues des collectes de l'année 2015 (collectes mensuelles sur 4 sites en Alsace et 2 sites en Bretagne).

Sur les années précédentes de la mandature du CNR, les sites qui ont été testés pour *Anaplasma* dans les tiques correspondent aux sites où des patients ont déclaré une anaplasmose en Alsace.

**Nombre de tiques *Ixodes ricinus* positives par site et par année
pour *Anaplasma phagocytophilum* de 2012 à 2015**



Parmi les 1106 nymphes testées en 2015, 4 étaient positives pour *A. phagocytophilum* : 3 collectées en Alsace (Illkirch, Niedermunster et Murbach) et 1 en Bretagne (Bois de Soevre).

Quatre nymphes étaient positives en 2015 à *A. phagocytophilum* soit 0,36 % (IC₉₅ = [0,10 – 0,92]). Ce taux n'est pas significativement différent de celui obtenu les années précédentes :

- en 2014 sur 3034 nymphes et qui avait montré un taux d'infection de 0,96 % (IC₉₅ = [0,64 – 1,37]).
- en 2013 la prévalence était de 0,8 % (IC₉₅ = 0,6-1,3]).
- en 2012, la prévalence était de 1,9 % (IC₉₅ = 0,8-4,3])

On observe une répartition uniforme d'*Anaplasma phagocytophilum*. Les sites de plaine autant que les sites de montagne sont positifs, de même que les sites péri-urbains (Pourtalès, Illkirch). Les cervidés et les rongeurs sont décrits comme des réservoirs importants de cette bactérie.

► *Borrelia* agents de fièvre récurrente et en particulier *Borrelia miyamotoi*

Borrelia miyamotoi est un agent de fièvre récurrente (FR) décrit pour la première fois en 1995 au Japon chez *Ixodes persulcatus*. Le premier cas d'infection humaine à *B. miyamotoi* n'a été décrit en Russie qu'en 2011. Puis en 2013, le 1^{er} cas humain a été rapporté en Europe (Hollande) chez un patient profondément immunodéprimé (Hovius et al. 2013). En 2016, un autre cas a été signalé en Allemagne chez un patient également profondément immunodéprimé (Boden et coll., Emerg Infect Dis. 2016).

Nous avons recherché dans les nymphes la présence de cette espèce de *Borrelia* et d'autres espèces responsables de fièvre récurrente depuis 2013.

Taux d'infection des tiques *I. ricinus* par site en 2013 et 2014 pour *B. miyamotoi* :

Site	2013			2014		
	Nombre nymphes positives / nymphes testées	Taux infection	IC _{95%}	Nombre nymphes positives / nymphes testées	Taux infection	IC _{95%}
Appenthal	6 / 364	1,65 %	[0,7-3,5]	4 / 423	0,95 %	[0,4-2,4]
Chêne Voltaire	2 / 175	1,14 %	[0,3-4,0]	2 / 177	1,13 %	[0,3-4,0]
Dannemarie	1 / 69	1,45 %	[0,3-7,8]	1 / 134	0,75 %	[0,1-4,1]
Daubensand	0 / 16	0 %	[0-19,4]	3 / 100	3 %	[1,0-8,4]
Fisrtplan	3 / 244	1,23 %	[0,4-3,6]	5 / 254	1,97 %	[0,8-4,5]
Haguenau	0 / 48	0 %	[0-7,4]	Non collecté		
Illkirch	4 / 256	1,56 %	[0,6-3,9]	6 / 297	2,02 %	[0,9-4,3]
Murbach	11 / 400	2,75 %	[1,5-4,9]	9 / 417	2,16 %	[1,1-4,0]
Niedermunster	6 / 374	1,6 %	[0,7-3,4]	4 / 219	1,83 %	[0,7-4,6]

Petite Camargue	0 / 3	0 %	[0-56]	1 / 91	1,1 %	[0,2-6,0]
Petite Pierre	0 / 62	0 %	[0-58]	Non collecté		
Pourtalès	4 / 125	3,2 %	[1,2-7,9]	1 / 154	0,65 %	[0,1-3,6]
Rimbach	8 / 299	2,68 %	[1,4-5,2]	3 / 292	1,03 %	[0,4-3,0]
Sattel	3 / 232	1,29 %	[0,4-3,7]	7 / 204	3,43 %	[1,7-7,0]
Wasserbourg	4 / 329	1,22 %	[0,5-3,1]	13 / 272	4,78 %	[2,8-8,0]

En 2015, nous avons recherché les *Borrelia* agents de FR sur les 1 106 nymphes collectées en Alsace et en Bretagne. La technique PCR utilisée est spécifique de l'ensemble des *Borrelia* agents de fièvre récurrente, suivi d'un séquençage du fragment PCR pour identifier l'espèce.

Site	Nymphes testées	Nymphes positives	Pourcentage	IC _{95%}
ALSACE				
Illkirch	276	8	2,9	[1,3 – 5,6]
Niedermunster	207	6	2,9	[1,1 – 6,2]
Dannemarie	192	2	1,0	[0,1 – 3,7]
Murbach	299	9	3,0	[1,4 – 5,6]
BRETAGNE				
Forêt de Rennes	79	0	0	[0,0 – 4,6]
Bois de Soeuvre	53	0	0	[0,0 – 6,7]

Au total, en 2015, tous sites confondus, le taux d'infection par les *Borrelia* agents de fièvres récurrentes en Alsace est de 2,57 % (IC₉₅ = [1,7 - 2,8]). Il est similaire à celui de 2014 où le taux d'infection par les *Borrelia* agents de FR était de 1,94 % (IC₉₅ = [1,5 – 2,5]).

Le séquençage de toutes les nymphes positives indiquent une seule espèce de *Borrelia* agents de fièvres récurrentes parmi les 1 106 nymphes testées : *B. miyamotoi* dans tous les cas depuis 2013.

En 2015, trois nymphes présentaient une co-infection à *Borrelia* (agents de la borréliose de Lyme) et à *Borrelia* du groupe fièvre récurrente (FR) :

- 2 nymphes positives à la fois pour *B. afzelii* et *B. miyamotoi*
- 1 nymphe positive pour *B. garinii* et *B. miyamotoi*.

En résumé :

- en 2015, le taux moyen d'infection des nymphes par *Anaplasma phagocytophilum* est de 0,36 % et le taux d'infection des nymphes par *Borrelia miyamotoi* est de 2,57 %
- pour l'ensemble des 5 années passées, nous avons observé de façon globale les mêmes résultats. Il est à noter qu'alors que l'on observe quelques cas d'anaplasmose humaine (Koebel et al. 2012 ; Edouard et al. 2012), aucun cas de fièvre récurrente à *Borrelia miyamotoi* n'a été décrit à ce jour en France. Ce pathogène nouvellement décrit doit continuer à faire l'objet d'une surveillance vectorielle et humaine.

L'information auprès des personnels de santé doit être renforcée afin que l'hypothèse *A. phagocytophilum* soit plus fréquemment évoquée chez les patients ayant des manifestations cliniques (fièvre notamment) après piqûre de tique et ayant un bilan clinique et biologique négatif pour la borréliose de Lyme.

2.4 Contribution à l'alerte

Durant la mandature actuelle, le CNR *Borrelia* a été régulièrement et de plus en plus fréquemment sollicité par de nombreux interlocuteurs, médecins (cliniciens et biologistes), patients (démarches individuelles et associations de patients), instances médicales officielles et sociétés savantes, INVS, DGS.

Ces sollicitations multiples correspondent à des actions directement ou indirectement liées à la divergence de pratiques cliniques et biologiques ne correspondant pas aux recommandations nationales ou européennes diagnostiques et thérapeutiques de la borréliose de Lyme.

3. LISTE DES PUBLICATIONS

3.1 Publications nationales (11)

2012

1. Sauer A., Hansmann Y., **Jaulhac B.**, Bourcier T., Speeg-Schatz C.
Ocular Lyme disease occurring during childhood : five case reports
J Fr Ophtalmol. 2012;35:17-22.

2013

2. Schramm F., Grillon A., **De Martino S.**, **Jaulhac B.**
La borréliose de Lyme. Revue Française des laboratoires
2013;457 : 35-49.
3. **De Martino S.**
Borréliose de Lyme : rappel sur l'agent infectieux, les examens biologiques : leur indication et leur interprétation
Archives de Pédiatrie. 2013;20 (5): H15–H16.

2014

4. **Boulangier N.**
La peau : un acteur clef dans les pathologies à transmission vectorielle
Lettre du CNEV (Centre National d'Expertise sur les Vecteurs) 2014 ; Mai n°5.
5. **Boulangier N.**
Prévention contre les tiques
Dermatologie Actualités. 2014 ; Avril-Mai n°141.
6. Blanc F, **B. Jaulhac B.**, Y. Hansmann, J.L. Dietemann, C. Tranchant. Borréliose de Lyme et neuroborréliose - EMC – Neurologie, 17-051-B-40.2014.

2015

7. **Boulangier N**, Lipsker D. [Protection against tick bites.] Prévention Contre Les Tiques. Ann Dermatol Venereol. 2015;142(4):245-51.
8. **Boulangier N, Jaulhac B.**
Borréliose de Lyme : impact de l'homme sur la persistance et la circulation de *Borrelia* dans l'environnement
Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, séance académique thématique à l'Institut Pasteur, Paris - 2015.
9. **Boulangier N.** Conduite à tenir en cas de piqûre de tique. Revue du Praticien, Médecine Générale. 2015 ;29 (948) : 679-680.

3.2 Publications internationales (25)

2012

1. Edouard S., Koebel C., Goehringer F., Socolovschi C., **Jaulhac B.**, Raoult D., Brouqui P.
Emergence of human granulocytic anaplasmosis in France
Ticks Tick Borne Dis. 2012;3 (5-6):403-5- **IF: 2,970.**
2. Levy E., Morruzzi C., Barbarini A., Sordet C., Cribier B., **Jaulhac B.**, Lipsker D
Clinical images: toe dactylitis revealing late Lyme borreliosis
Arthritis Rheum. 2012; 64 (4):1293- **IF 7.423.**
3. Hidri N., Barraud O., **de Martino S.**, Garnier F., Paraf F., Martin C., Sekkal S.,
Laskar M., **Jaulhac B.**, Ploy MC.
Lyme endocarditis. Clin Microbiol Infect. 2012;18 (12):E531-2- **IF=5.059.**
4. Patramool S., Choumet V., Surasombatpattana P., Sabatier L., Thomas F.,
Thongrunkiat S., Rabilloud T., **Boulanger N.**, Biron DG., Missé D.
Update on the proteomics of major arthropod vectors of human and animal pathogens
Proteomics. 2012;12 :3510-23- **IF : 4,07.**
5. Schramm F., Kern A., Barthel C., Nadaud S., Meyer N., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.**
Microarray analyses of inflammation response of human dermal fibroblasts to different
strains of *Borrelia burgdorferi* sensu strict
PLoS One. 2012; 7 (6):e40046- **IF : 3,702.**
6. Koebel C., Kern A., Edouard S., Hoang AT., Celestin N., Hansmann Y., **Jaulhac B.**,
Brouqui P., **De Martino SJ.**
Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory
diagnosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;72 (3):214-8- **IF=2.460.**

2013

7. Vu Hai V. , Almeras L., Audebert S., Pophillat M., **Boulanger N.**, Parola P., Raoult D.,
Pages F.
Identification of salivary antigenic markers discriminating host exposition between two
European ticks: *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor reticulatus*
Comp Immuno. Microbiol Infect Dis. 2013; 36 :39-53- **IF : 2,01.**
8. Vu Hai V., Pagès F., **Boulanger N.**, Audebert S., Parola P., Almeras L.
Immunoproteomic identification of antigenic salivary biomarkers detected by *Ixodes*
ricinus-exposed rabbit sera.
Ticks Tick Borne Dis. 2013; 4:459-468- **IF : 3,36.**

2014

9. Bernard Q., **Jaulhac B.** **Boulanger N.**
Smuggling across the border: How arthropod-borne pathogens evade and exploit the host
defense system of the skin
Invest Derm. 2014; 134:1211-9- **IF : 6,91.**
10. Pages F., Dautel H., Duvallet G., deGentile L., **Boulanger N.**
Repellents for human use: prevention of tick bites and tick-borne diseases
Vector borne and zoonotic diseases. 2014; 14(2):85-93- **IF: 2,73.**

11. Schramm F., Gauthier-Clerc M., Fournier JC., McCoy KD., Barthel C., Postic D., Handrich Y., Le Maho Y., **Jaulhac B.**
First detection of *Borrelia burdorferi* sensu lato DNA in king penguins (*Aptenodytes patagonicus halli*)
Ticks Tick Borne Dis. 2014;5 (6):939-42- **IF= 2,970.**
12. Vandenesch A., Turbelin C., Couturier E., Arena C., **Jaulhac B.**, Ferquel E., Choumet V., Saugeon C., Coffinieres E., Blanchon T., Vaillant V., Hanslik T.
Incidence and hospitalisation rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012
EuroSurveill. 2014; 19 (34)- **IF : 4, 65.**
13. Dessau RB., Fingerle V., Gray J., Hunfeld KP., **Jaulhac B.**, Kahl O., Kristoferitsch W., Stanek G., Strle F.
The lymphocyte transformation test for the diagnosis of Lyme borreliosis has currently not been shown to be clinically useful
Clin Microbiol Infect. 2014; 20 (10): O786-7- **IF : 5,059.**
14. Blanc F., Philippi N., Cretin B., Kleitz C., Berly L., Jung B., Kremer S., Namer IJ., Sellal F., **Jaulhac B.**, De Seze J.
Lyme Neuroborreliosis and Dementia
J. Alzheimer Dis. 2014;41 (4): 1087-93- **IF= 3,092.**

2015

15. Bernard Q., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.**
Skin and arthropods: an effective interaction used by pathogens in vector-borne diseases
Eur J Dermatol. 2015; 25 (Suppl 1):18-22- **IF : 1,990.**
16. Dessau RB., Fingerle V., Gray J., Hunfeld KP., **Jaulhac B.**, Kristoferitsch W., Stanek G., Strle F.
The authors reply to comments on "The lymphocyte transformation test for the diagnosis of Lyme borreliosis has currently not been shown to be clinically useful
Clin Microbiol Infect. 2015 ;21(3):e21- **IF : 4,57.**
17. Kern A., Schnell G., **Bernard Q.**, Bœuf A., **Jaulhac B.**, Collin E., Barthel C., Ehret-Sabatier L., **Boulanger N.**
Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto population and its involvement in *Borrelia* pathogenicity: study on murine model with specific emphasis on the skin interface
PloS One. 2015;10 (7), e0133195- **3,702.**
18. Schnell G., Bœuf A., **Jaulhac B.**, **Boulanger N.**, Collin E., Barthel C., **De Martino S.**, Ehret-Sabatier L.
Proteomic analysis of three *Borrelia burgdorferi* sensu lato native species and disseminating clones: relevance for Lyme vaccine design
Proteomics. 2015;7 (15),1280-90- **IF : 4,07.**
19. Schnell G., Boeuf A., Westermann B., **Jaulhac B.**, Lipsker D., Carapito C., **Boulanger N.**, Ehret-Sabatier L.
Discovery and targeted proteomics on cutaneous biopsies infected by *Borrelia* to investigate Lyme disease
Mol Cell Proteomics. 2015 ; 14 (5), 1254-64- **IF : 6,886.**

3.3 Communications nationales (12)

2012

1. Jaulhac B.

Diagnostic biologique de la maladie de Lyme
Conférence « Actualités en Infectiologie » - Groupement Hospitalier Nord, Maladies Infectieuses et tropicales – Hôpital de la Croix Rousse
Lyon, 26 janvier 2012.

2. Boulanger N.

Projets entomologiques prévus au sein du CNR « *Borrelia* pour le plan 2012-2015
Réunion scientifique REID « Maladies à tique »
Clermont-Ferrand, 14-17 novembre 2012.

3. Hansmann Y., Sferrazza S., Lefebvre N., Zachary P., De Martino S., Jaulhac B., Christmann D.

Borréliose de Lyme impact de l'abaissement du seuil de positivité du dépistage sérologique
13èmes Journées Nationales d'infectiologie
Tours, 08-10 Juin 2012.

2013

4. Bernard Q., Jaulhac B., Boulanger N.

The Role of Toll-like Receptors During the Early Transmission of Lyme Disease
Journées de Microbiologie de Strasbourg
8 avril 2013.

5. Martz G., Hansmann Y., Lefebvre N., Blanc F., De Martino S., Tranchant C., Christmann D

Pronostic à long terme des neuroborrélioses (NB) après traitement
14èmes Journées Nationales d'Infectiologie
Clermont Ferrand, 12-14 Juin 2013.

6. De Martino S., Schramm F., Zilliox L., B. Jaulhac B.

Identification des souches de *Borrelia* par spectrométrie de masse Maldi-Tof : développements techniques, constitution d'une base de données spectrales et application en bactériologie clinique au CNR *Borrelia*.
33^{ème} RICA, Paris, 21-22 novembre 2013.

2014

7. Bernard Q., Gallo R., Nakatsuji T., Jaulhac B., Boulanger N.

Le Crosstalk TLR2/TLR3 au niveau de la peau et son implication dans la physiopathologie de la Borréliose de Lyme
REID, Montpellier, Février 2014.

8. Goldstein V., George JC., Zilliox L., Delena C., Jaulhac B., Ferquel E., Boulanger N.

Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace en 2012 et 2013
REID, Montpellier, Février 2014.

9. Grillon A., Westermann B., **Jaulhac B.**, Sabatier L., **Boulangier N.**
Tropisme cutané de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto dans le développement de la borréliose de Lyme : mise en évidence sur un modèle murin
Journées de Microbiologie de Strasbourg, 3 Avril 2014.
10. Goldstein V., **Jaulhac B.**, George JC., **Zilliox L.**, Delena C., Ferquel E., **Boulangier N.**
Borréliose de Lyme : Surveillance du vecteur *Ixodes ricinus* en Alsace en 2012 et 2013
Société Française de Parasitologie, Reims, 21-23 Mai 2014.
11. Bernard Q., Gallo R., **Jaulhac B.**, Lipsker D., Nakatsuji T., Luft B., Yang X., **Boulangier N.**
Potential role of the crosstalk TLR2/TLR3 during the early transmission of Lyme borreliosis
Journée de la Fédération de Médecine de Strasbourg, 1-2 juillet 2014.
Prix de thèse pour Quentin Bernard
12. Grillon A., Twizeyimana E., Schramm F., **Zilliox L.**, **Jaulhac B.**, **De Martino S.**
Caractéristiques des arthrites de Lyme PCR positives dans les liquides et tissus articulaires ; données 2012-2014
RICAI ; Paris, 27 novembre 2014.

2015

13. **Boulangier N.** Approche protéomique par spectrométrie de masse ciblée afin d'identifier des biomarqueurs cutanés lors de la transmission précoce de la borréliose de Lyme.
Réunion du REID, groupe tique, Lyon, 25-26 avril 2015.

3.4 Communications internationales (18)

2012

1. **Boulangier N.**, Kern A., Schramm F., Barthel C., Collin E., Marchal C., **Jaulhac B.**
Modification of skin homeostasis during the early transmission of Lyme disease to the vertebrate host
Gordon Conference on Spirochetes, Ventura (California, USA), 22-27 Janvier 2012.

2013

2. **Boulangier N.**, Kern A., Schnell G., Boeuf A., Sabatier L., **De Martino S.**, **Jaulhac B.**
Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* ss population and its involvement on *Borrelia* virulence : study on a murine model
Congrès International "Lyme disease and other tick borne diseases", Boston (USA)
18-21 août 2013.
3. Schramm F., Gauthier-Clerc M., Fournier JC., Mccoy KD., Barthel C., Postic D., Handrich Y., Le Maho Y., **Jaulhac B.**
First detection of Lyme disease *Borrelia* DNA in king penguins (*Aptenodytes patagonicus halli*)
Congrès International "Lyme disease and other tick borne diseases", Boston (USA)
18-21 août 2013.

2014

4. Bernard Q., Gallo R., Nakatsuji T., **Jaulhac B., Boulanger N.**
The TLR2/TLR3 crosstalk in the skin and its involvement in the physiopathology of Lyme borreliosis
Gordon conference on Spirochetes, Ventura (California, USA), 18-24 janvier 2014.
5. **De Martino S., Jaulhac B., Boulanger N.,** Gastinger G., Reitzer C., Hansmann Y., Christmann D.
Survey of three tick borne diseases in Alsace, France: Lyme disease, Tick Borne Encephalitis and Anaplasmosis
Journée Mondiale OMS sur les maladies à Transmission vectorielle
Fribourg (Allemagne), 7 avril 2014.
6. **De Martino S., Jaulhac B.**
Identification of *Borrelia burgdorferi* complex species using Maldi-Tof Mass Spectrometry, it's possible
24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
Barcelone (Espagne), 10-13 mai 2014.
7. Schnell G., Westermann B., Boeuf A., **Jaulhac B., Boulanger N.,** Sabatier L.
SRM as a new efficient detection tool for the early diagnosis of Lyme disease
62nd Conference American Society for Mass Spectrometry
Baltimore (USA), 15-19 Juin 2014.
8. Westermann B., Schnell G., Grillon A., Boeuf A., **Jaulhac B., Boulanger N.,** Ehret-Sabatier L.
Discovery and targeted proteomics for the diagnosis of lyme disease
Ecole d'été en protéomique, Brixen/Bressanone (Italie), 3-9 août 2014.
9. Schnell G., Boeuf A., Westermann B., **Jaulhac B.,** Carapito C., **Boulanger N.,** Sabatier L.
SRM as a new efficient detection tool for the early diagnosis of the Lyme disease : 20th International Mass Spectrometry
Conference (IMSC), Genève (Suisse) 24-29 août 2014.
10. De Martino S., **Jaulhac B.**
Identification of *Borrelia burgdorferi* complex species using Maldi-Tof Mass Spectrometry, it's possible
24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease
Barcelone (Espagne), 10-13 mai 2014.
11. Bernard Q., Gallo R., **Jaulhac B.,** Lipsker D., Nakatsuji T., Luft B., Yang X., **Boulanger N.**
TLR2/TLR3 crosstalk during the early transmission of Lyme borreliosis
4th international symposium on the skin physiology, Vichy (France)
20-21 octobre 2014.
Premier prix de recherche pour Quentin Bernard

2015

12. Grillon A., **Boulanger N.,** Westermann B., Sabatier L., **Jaulhac B.**
Proteomics approach to identify biomarkers of active Lyme disease in disseminated manifestations
ECCMID, Copenhague (Danemark), 25-28 avril 2015.

13. **Hansmann Y.**, Martinot M., Kieffer P., Sauleau E., **Jaulhac B.**, **De Martino S.**
Diagnostic value of PCR for anaplasmosis in France
25th ECCMID Congress, Copenhagen, 25-28 Avril 2015.
14. Bernard Q., Gallo R., **Jaulhac B.**, Schnell G., Boeuf A., Westermann B., Ehret-Sabatier L., Nakatsuji T., Luft B., Yang X., **Boulangier N.**
Ixodes tick saliva: a potent controller at the skin interface of early Lyme transmission
Keystone meeting, Taos, USA, 12-17 mai 2015.
15. Meddeb M., Carpentier W., Cagnard N., Nadaud S., **Jaulhac B.**, **Boulangier N.**, Schramm F.
Microarray analyses of inflammation response of human dermal fibroblasts to different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*
14th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases (ICLB), Vienne, Autriche, 27-30 septembre 2015.
16. Meddeb M., **De Martino S.**, **Zilliox L.**, Grillon A., Schramm F., Napolitano D., **Jaulhac B.**
Broad-range PCR in *Borrelia*-negative erythema migrans lesions: can we find other tick-borne pathogens?
14th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases (ICLB), Vienne, Autriche, 27-30 septembre 2015.

3.5 Conférences *sur invitation* (50)

2012

1. **Boulangier N.**
Reference center on Lyme disease and transmission of *Borrelia*
Symposium on ticks and tick borne diseases
Speyer (Allemagne) 22-23 Février 2012.
2. **Jaulhac B.**, Hansmann Y.
Conférence « Borréliose de Lyme »
Forum de la Faculté de Médecine, Strasbourg, 19 juin 2012.
3. **Jaulhac B.**, Kieffer P.
Conférence « Borréliose de Lyme »
Centre Hospitalier de Mulhouse, 28 juin 2012.
4. **Jaulhac B.**
Conférence « Borréliose de Lyme : actualités depuis la conférence de consensus »
Centre Hospitalier de Lyon, 25 janvier 2012.
5. **Boulangier N.**
Les tiques d'importance médicale
Journées de la Société de Médecine des Voyages
Strasbourg, 5-6 octobre 2012.
6. **Boulangier N.**
Mesures de prévention contre les morsures de tiques
Journées de la Société de Médecine des Voyages
Strasbourg, 5-6 octobre 2012.

7. Jaulhac B.

Conférence « Maladie de Lyme ». Club III
Communauté Israélite de Strasbourg
27 novembre 2012.

8. Jaulhac B.

Expert invité - ECDC Meeting « Critical reappraisal of laboratory tests for Lyme borreliosis in the EU »
Stockholm (Suède), 29-30 novembre 2012.

2013

9. Koebel C., Jaulhac B., De Martino S.

Human Anaplasmosis in Europe
23^{ème} European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
Berlin (Allemagne), 28 avril 2013.

10. De Martino S.

Borréliose de Lyme : rappels sur l'agent infectieux, les examens biologiques – leurs indications et leur interprétation
Congrès de la Société Française de Pédiatrie, Clermont-Ferrand, 17 mai 2013.

11. Jaulhac B.

La borréliose de Lyme : actualités
Séminaire interne, CHU de Lausanne (Suisse), 17 juin 2013.

12. Jaulhac B.

Zoonotic infections transmitted by ticks in Europe
71st Annual Assembly of the Swiss Society for Microbiology : Emerging in a Changing World
Interlaken (Suisse), 27 Juin 2013.

13. Jaulhac B. Expert invité - ECDC Meeting

« Expert consultation on laboratory testing of Lyme borreliosis »
Amsterdam (Pays-Bas), 23-24 octobre 2013.

14. Jaulhac B.

La borréliose de Lyme : épidémiologie et critères diagnostiques en 2013
Colloque Inserm Interface Rhumatologie-Dermatologie
Paris, 13 novembre 2013.

15. Jaulhac B.

Rôle du CNR des *Borrelia*. Colloque du SNBH
Strasbourg, 03 octobre 2013.

2014

16. Jaulhac B.

Session de Formation ARS ALSA(CE)TIQUE
Institut de Formation des soins infirmiers
Centre Hospitalier de Mulhouse, 23 janvier 2014.

17. De Martino S. Session de Formation ARS ALSA(CE)TIQUE

Hôpitaux Civils, Centre de Formation de Colmar, 30 janvier 2014.

- 18. Jaulhac B.**
Réunion du Comité Scientifique du groupe ESGBOR, Vienne (Autriche)
31 janvier-1^{er} février 2014.
- 19. Jaulhac B.**
Session de Formation ARS ALSA(CE)TIQUE
Institut de Formation des soins infirmiers
Haguenau, 6 février 2014.
- 20. De Martino S.**
Practical diagnosis of arthropod-borne infections
ESCMID Postgraduate Education Course
Marseille, 17-19 mars 2014.
- 21. De Martino S.**
Intervenant Conférence « Maladie de Lyme »
Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Paris, 19 mars 2014.
- 22. Jaulhac B.**
Lyme borreliose : from bench to bedside
24th ECCMID, Barcelone (Espagne), 10-13 mai 2014.
- 23. Jaulhac B., Boulanger N.**
Prévention des maladies transmises par les tiques
Séminaire DPPS, Agence Régionale de Santé d'Alsace, 13 mai 2014.
- 24. Jaulhac B.**
La Maladie de Lyme, Atelier SIEMENS
Paris, 21-22 mai 2014.
- 25. Jaulhac B.**
Session de Formation ARS ALSA(CE)TIQUE
Institut de Formation des Soins Infirmiers
Centre Hospitalier de Colmar, 5 Juin 2014.
- 26. Grillon A., Twizeyimana E., Schramm F., Zilliox L., Jaulhac B., De Martino S.**
Caractéristiques des arthrites de Lyme PCR positives dans les liquides et tissus articulaires.
Données 2012-2014 du CNR *Borrelia*
34^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse
Paris, 27-28 novembre 2014.
- 2015**
- 27. Boulanger N.**
Borreliose de Lyme : impact de l'homme sur la persistance et la circulation de *Borrelia* dans l'environnement
Académie Vétérinaire de France, séance académique thématique
Institut Pasteur, Paris, 29 janvier 2015.
- 28. Grillon A., Westermann B., Sabatier L., Jaulhac B., Boulanger N.**
Identification de marqueurs d'infection active cutanés à la phase tardive de la Borréliose de Lyme par protéomique ciblée
Journée de Microbiologie de Strasbourg, 3 mars 2016.

- 29. Jaulhac B.**
Histoire de la Microbiologie : La maladie de Lyme
11^e Congrès National de la Société Française de Microbiologie
23-25 mars 2015, Paris.
- 30. Grillon A., Westermann B., Sabatier L. Schnell G. Jaulhac B., Boulanger N.**
Identification de biomarqueurs cutanés lors de la transmission précoce de la Borréliose de Lyme par Protéomique ciblée
Journées de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), 16-17 Avril 2015.
- 31. Boulanger N.**
Borréliose de Lyme : de l'animal à l'homme. Maladies vectorisées par les tiques
Rencontres de Belle Ile en mer, 24-25 avril 2015.
- 32. Boulanger N.**
Borréliose de Lyme : nouvelle approche de diagnostic direct par protéomique
Maladies vectorisées par les tiques
Rencontres de Belle Ile en mer, 24-25 avril 2015.
- 33. Boulanger N.**
Borréliose de Lyme : L'anaplasmose humaine : actualités
Maladies vectorisées par les tiques.
Rencontres de Belle Ile en mer, 24-25 avril 2015.
- 34. Boulanger N.**
Borréliose de Lyme: épidémiologie et impact des changements environnementaux sur le risque émergent. Tiques et maladies à tiques : impact en santé humaine et vétérinaire
Journée thématique du CNEV (Centre National d'Expertise sur les Vecteurs)
Paris, 20 mai 2015.
- 35. Boulanger N.**
La prévention contre les tiques en médecine humaine. Tiques et maladies à tiques : impact en santé humaine et vétérinaire
Journée thématique du CNEV (Centre National d'Expertise sur les Vecteurs)
Paris, 20 mai 2015.
- 36. Jaulhac B.**
Place de la biologie dans le diagnostic de la maladie de Lyme en France.
Colloque « les maladies transmises par les tiques et leur prévention en Alsace »
Faculté de Médecine de Strasbourg, Strasbourg, 3 juin 2015.
- 37. Boulanger N.**
La tique et la transmission de pathogènes. Colloque « les maladies transmises par les tiques et leur prévention en Alsace »
Faculté de Médecine de Strasbourg, Strasbourg, 3 juin 2015.
- 38. Boulanger N.**
Existe-t-il d'autres voies pour la prévention ?
Colloque « les maladies transmises par les tiques et leur prévention en Alsace »
Faculté de Médecine de Strasbourg, Strasbourg, 3 juin 2015.
- 39. Jaulhac B.** La borréliose de Lyme. **Réunion CHSCT - ONF**
« Les tiques – Mieux les connaître pour s'en protéger - La maladie de Lyme »
Yenne/Chambéry, 13 octobre 2015.

- 40. Jaulhac B.**
La borréliose de Lyme en 2015
Conférence au CHU de Lille, 17 février 2015.
- 41. Jaulhac B.**
La borréliose de Lyme : de la tique à l'homme
Conférence au CH de Pontoise « Les borrélioses de Lyme »
Pontoise, 02 février 2016.
- 42. Jaulhac B.**
Les borrélioses : actualités 2016
Colloque des biologistes du Grand-Est.
Ventron, 28 avril 2016.
- 43. Boulanger N.**
La tique et la transmission de pathogènes
Séminaire transfrontalier France-Allemagne
Strasbourg, France. 3 Juin 2015
Co-organisation : N Boulanger (CNR) et C. Reitzer (ARS).
- 44. Boulanger N.**
Existe-t-il d'autres voies pour la prévention contre les tiques en médecine humaine ?
Séminaire transfrontalier France-Allemagne
Strasbourg, France. 3 Juin 2015
Co-organisation : N Boulanger (CNR) et C. Reitzer (ARS).
- 45. Boulanger N.**
Skin and Lyme borreliosis : why does it deserve further investigations ?
International Congress on Lyme borreliosis, Vienne (Autriche)
27-30 septembre 2015.
- 46. Boulanger N.**
Modèle animal expérimental
Conférences à la journée *Borrelia* organisée par la Société Française de Microbiologie
ASIEM, Paris, 3 novembre 2015.

3.6 *Brevets (2)*

- 1. Boulanger N., Sabatier L., Jaulhac B.**
Protéines candidates pour un vaccin contre la maladie de Lyme. Brevet N° 1358017
(WO 2015022470 A3), 16 août 2013.
- 2. Boulanger N., Sabatier L., Jaulhac B.**
Protéines candidates pour un vaccin contre la maladie de Lyme. Brevet N° 1551182 (WO
2016128687), 13 février 2015.

3.7 Contribution à des chapitres ou des ouvrages

1. **Boulanger N., de Gentile L.**
Rédaction du chapitre sur les Répulsifs
Duvallet G., de Gentile L. (sous la direction de)
Protection personnelle antivectorielle
alt Collection Didactiques, **IRD** Editions, Marseille, 2012, 352 pp.
2. **De Martino S.**
Chapitres "*Borrelia*" et "Syphilis" du
REMIC 2^{ème} 3^{ème} 4^{ème} 5^{ème} éditions
Editions Ellipses, Paris 2004, 2007, 2010, **2015**.
3. **Mc Coy K., Boulanger N.**
(Ed). Tiques et maladies à Tiques : biologie, écologie évolutive et épidémiologie
Editions IRD. Sous presse (2016). pp. 344.
4. **Boulanger N., Pechère M. et JC., Durupt F., Lipsker D.**
Dermatoses microbiennes : Flore cutanée normale et mécanismes de défense contre
l'infection
In : Encyclopédie de Dermatologie et Infections sexuellement transmissibles
6^{ème} édition, Elsevier Masson. Sous presse (2016).
5. **Bonnet S., Boulanger N.**
Ixodes tick saliva: a potent controller at the skin interface of early *Borrelia burgdorferi*
sensu lato transmission
Chapitre de: Arthropod vector: controller of disease transmission, volume 2: vector saliva-
host pathogen interactions
Editeurs: S. K. Wikel, S. Aksoy, G. Dimopoulos. Elsevier, sous presse
6. **Bernard Q., Jaulhac B., Boulanger N.**
Chapter 24: *In vitro* model of cutaneous inflammation
In : *Borrelia burgdorferi* : Methods and protocols
U. Pal and O. Buyuktanir ed, Springer. Sous presse.
7. **Boulanger N., McCoy. K.**
Chapitre de livre: Les tiques, pour l'ouvrage
Entomologie médicale et vétérinaire
Editeurs G. Duvallet et V. Robert. Sous presse.
8. **Boulanger N., Haberer P., Pfeiffer T.**
Sur les traces de la maladie de Lyme : le loup, la tique et la forêt. De qui faut-il vraiment
avoir peur ?
Editons : I.D. l'Édition, sous presse.
9. **De Martino S., Twizeyimana E., Boulanger N., Schramm F., Jaulhac B.**
Borrelia spp.
In : Précis de Bactériologie Clinique
Freney J, Renaud FNR, Leclercq R, Riegel P.
éditeurs, ESKA Editions, sous presse (2016).

3.8 Contribution à des partenariats ou collaborations avec des structures ou instances nationales ou internationales

3.8.1 Membres de réseaux nationaux

N. Boulanger :

- Membre du **réseau CNEV: Centre National Expertise des Vecteurs**. Responsable. Dr. D. Fontenille. Expert pour les tiques. Membre du consortium CNEV
- Membre du **réseau REID** (Réseau des Interactions durables : Maladies à Tiques) Réunion annuelle tenue en 2012 à Clermont-Ferrand. Dans ce cadre, un projet de rédaction de livre sur les tiques est en cours et devra être finalisé pour fin 2013. Coordinatrices : K. McCoy et N. Boulanger.

B. Jaulhac :

- Expert pour le réseau Sentinelles :
- membre du comité de pilotage du **réseau Sentinelles** – Inserm UMR –S 707 sur l'étude de l'incidence de la borréliose de Lyme en France
- relecture du rapport annuel d'activité pour le domaine de compétence du CNR *Borrelia*.

3.8.2 Groupe européen EUCALB – ESGBOR

Un groupe européen travaillant sur la borréliose de Lyme, le groupe **ESGBOR** (European Study Group on Lyme Borreliosis) a été officiellement créé au sein de l'ESCMID (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases). Il a été officialisé à l'ECCMID en avril 2012.

A l'été 2016, le groupe ESGBOR comprend 75 membres de 30 pays.

- Un comité de pilotage du groupe ESGBOR se réunit une fois par an à Vienne et le CNR *Borrelia* fait partie du comité de pilotage.
- Le groupe ESGBOR dans son ensemble se réunit annuellement lors du congrès de l'ECCMID.
- Différents axes de travail et de projet de recherche européens sont étudiés :
 - o étude du risque de développement d'une borréliose de Lyme après piqûre de tiques
 - o étude du rôle des grands mammifères sur l'abondance des tiques
 - o Paramètres influençant la densité des tiques
 - o Evaluation multicentrique des tests sérologiques – constitution d'une sérothèque européenne
 - o Apport de la technique MLSA dans la connaissance des espèces de *B. burgdorferi* sl.
 - o Mise en place d'une évaluation multicentrique des méthodes de PCR *Borrelia* utilisées au sein du groupe ESGBOR. Ce travail a fait l'objet d'un poster au congrès ICLB à Vienne à l'automne 2015
- Le groupe a réalisé pendant la mandature des publications communes sur la valeur des tests de transformation lymphocytaire pour le diagnostic de la borréliose de Lyme. Un travail commun sur la place des tests biologiques est en cours de rédaction.

- Un autre travail a débuté sur la proposition de protocole de traitement antibiotique des différentes formes de borréliose de Lyme

Parallèlement, le groupe répond aux demandes des praticiens, biologistes et patients qui s'adressent à eux. Trois à huit demandes sont prises en charge par an par B. Jaulhac dans ce cadre.

3.8.3 Participation à des réunions de l'ECDC

Durant la mandature, le CNR *Borrelia* français a participé à plusieurs réunions de l'ECDC sur la borréliose de Lyme. Les thèmes de réunions ont porté sur :

- une réunion sur l'évaluation des tests sérologiques pour le diagnostic de la borréliose de Lyme en Europe (Novembre 2012 – Stockholm)
- une 2^{ème} réunion sur ce thème a eu lieu en octobre 2013 à Amsterdam. Ces 2 réunions ont conduit à un travail de méta-analyse de la littérature donnant lieu à un rapport ECDC « A systematic literature review on the diagnostic accuracy of serologicla tests for Lyme borreliosis » paru en 2016. Ce travail a fait l'objet d'un article sur ce thème, paru en 2016 dans « BMC Infectious Diseases » auquel le CNR est associé
- une réunion sur les tendances sur l'épidémiologie de la borréliose de Lyme en Europe (Mai 2015 – Amsterdam)
- une réunion sur les modalités de surveillance de la la borréliose de Lyme en Europe et notamment de la neuroborréliose a eu lieu en janvier 2016 à Stockholm Le CNR y participait en tant qu'animateur de tables rondes accompagné d'un collègue neurologue français, le Dr. F. Blanc, convié à partager son expérience.

4. DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE ET MISE EN OEUVRE AU LABORATOIRE

Description de la démarche qualité du laboratoire :

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

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

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

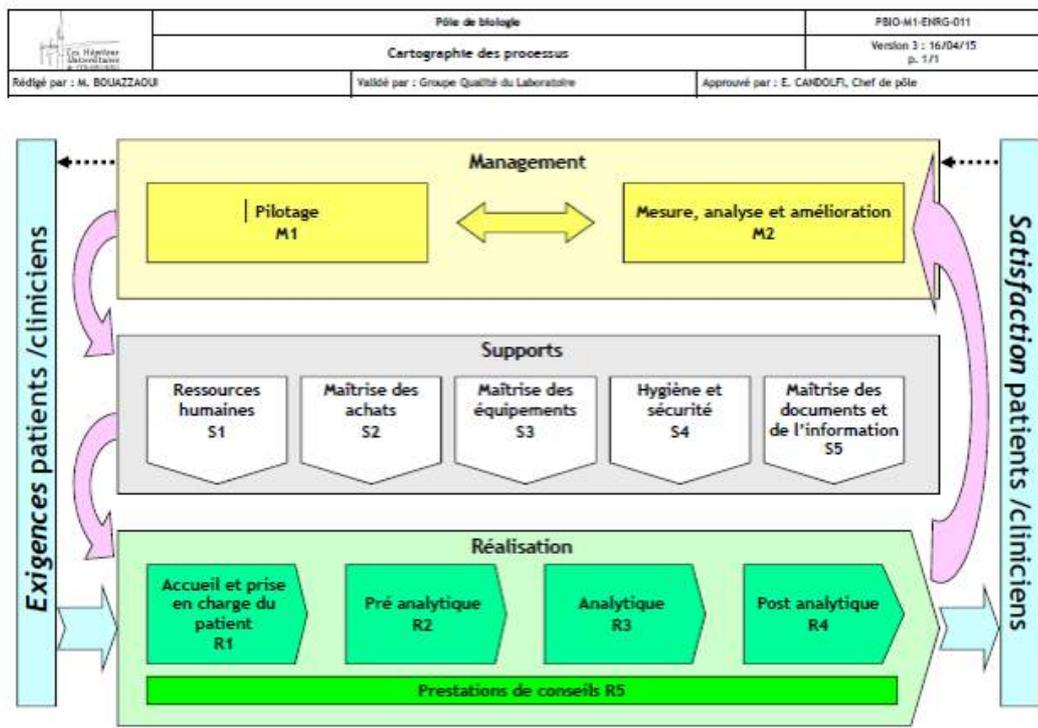
Les processus du laboratoire sont :

- Les processus de management dont la finalité est de :
 1. Définir la politique qualité et les objectifs « qualité »
 2. Décliner la politique et les objectifs en actions,

3. Surveiller, mesurer et analyser les processus, les prestations et le niveau de satisfaction des clients et des partenaires.
- Les processus supports qui fournissent les ressources nécessaires aux processus de réalisation,
 - Les processus de réalisation qui correspondent aux différentes activités du laboratoire : accueil du patient, préanalytique, analytique, postanalytique et prestations de conseils ; ils permettent de satisfaire aux attentes des clients et des partenaires.

Une cartographie décrit les différents processus du laboratoire et leurs interactions

(PBIO-M1-ENRG-011_Cartographie des processus)



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

- Acquisition d'un logiciel de gestion des événements indésirables (EI) Norméa® par les HUS avec déploiement au pôle de Biologie et au CNR en 2014
- Mise en place d'un système documentaire basé sur l'approche processus
- **Acquisition d'un logiciel de gestion documentaire Norméa® en 2015 par les HUS avec déploiement prévu au pôle de Biologie fin 2016 et au CNR en 2017**
- Une organisation qualité avec le groupe qualité des laboratoires composé des pilotes et copilotes de processus, des référents spécifiques, des responsables qualité des structures, des cadres de santé et de la cellule qualité du pôle

Voici les éléments mis en place entre 2012 et 2014 :

- Réception et enregistrement des envois extérieurs d'échantillons biologiques (sérums, LCR, biopsies cutanées en vue de la réalisation de sérologies, PCR spécifiques et culture)
- Rédaction de modes opératoires (MOPE) spécifiques de l'activité du CNR (37 MOPE)
- Traçabilité de la gestion du matériel et des réactifs utilisés dans le cadre des activités du CNR (Suivi des enceintes thermostatées utilisées pour le stockage des réactifs et des échantillons en continu via un système centralisé ; suivi des équipements via un logiciel de Gestion des Maintenances Assistée par Ordinateur ou GMAO ; gestion des réactifs et consommables par lot et par arrivage)
- Mise en place de fiches de non conformités et traitement de ces non conformités, avec acquisition du logiciel Norméa depuis 2014
- Instauration et suivi des contrôles internes de qualité (CIQ) en sérologie et en biologie moléculaire. En sérologie, les CIQ étaient initialement produits par le CNR lui-même à partir de sérums bien définis, puis remplacés depuis 2013 par des contrôles commerciaux : Accurun® monoparamétriques IgG et IgM en plus des contrôles des trousses.
- Inscription aux programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) :
 - de Labquality® depuis 2013 comprenant 4 évaluations par an pour la sérologie de Lyme
 - et de QCMD® depuis 2015 comprenant 8 à 12 échantillons par an pour la PCR de détection et de typage *Borrelia*.

Cette démarche s'est poursuivie en 2015. Voici les actions réalisées en 2015 au sein du CNR concernant chaque processus.

Processus de management

Pilotage de la qualité :

- Le CNR des *Borrelia* s'intègre dans la politique qualité du pôle de Biologie.
- Au même titre que le chef du pôle de biologie, le Pr Jaulhac s'est engagé à soutenir la démarche qualité du CNR.

Mesure, analyse et amélioration :

- Contrôles internes de qualité :
 - Des CIQ continuent à être intégrés à chaque série d'analyse.
 - Pour la sérologie de Lyme, outre les CIQ proposés par le fournisseur et après évaluation de CIQ commerciaux indépendants, le CNR a opté pour une utilisation de trois CIQ dans chaque série analytique en microplaque (contrôles négatif et positif de trousses, ainsi qu'un contrôle positif commercial indépendant en IgG et en IgM).
 - La qualification de chaque lot de CIQ est réalisée sur une période probatoire. Elle

permet de définir la moyenne et l'écart-type acceptable pour chaque CIQ. Les résultats des différents CIQ sont saisis dans des tables de calculs permettant la réalisation de courbes de suivi (diagrammes de Levey Jennings). L'exploitation des résultats est réalisée à chaque série d'analyse en suivant les règles définies par Westgard. Une conduite à tenir a été établie en cas de dérive des CIQ. Elle est détaillée dans le mode opératoire BACT-M2-MOPE-002, intégré au système de management de la qualité (SMQ) du laboratoire.

- o Pour la recherche de *Borrelia* et *Borrelia* par biologie moléculaire, des CIQ (témoins positif d'amplification, négatif d'extraction), continuent également à être intégrés à chaque série d'analyse.

- Evaluations externes de la qualité (EEQ) :

- o Le CNR s'est inscrit de 2014 à 2014 au programme d'EEQ de Biologie prospective® et en 2015 au programme d'EEQ organisé par Labquality® comprenant 2 sérums 4 fois par an pour le sérodiagnostic de dépistage de la maladie de Lyme : nous avons obtenu 100 % de conformité depuis 2012.
- o Le CNR s'est également inscrit pour 2015 au programme d'EEQ organisé par QCMD® comprenant 10 échantillons par an pour la recherche de *Borrelia* par biologie moléculaire. En 2015, nous avons obtenus 100 % de conformité pour les 10 échantillons analysés contenant les ADN spécifiques de différentes espèces de *Borrelia* (*B. miyamotoi*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* et *B. bavariensis*).

➤ **Traitement des événements indésirables :**

- En 2015, 4 événements indésirables concernant le CNR ont saisis dans Normea®. Il s'agissait de problèmes liés à la métrologie qui ont tous été résolus.

- **Audits qualité :**

- o Le CNR suit la politique d'audit définie par le pôle de Biologie.
- o En décembre 2015, un audit qualité interne a été confié à un prestataire extérieur (cabinet Duranton®) en vue de la présentation à l'accréditation du sérodiagnostic de dépistage de la maladie de Lyme.
- o 2 écarts ont été notifiés :
 - Enceinte thermostatée de stockage des réactifs non cartographiée à la date prévue.
 - Absence de preuve d'habilitation du personnel médical en charge de la validation de méthode.
 - Ces 2 écarts seront levés en 2016.

Processus support

Ressources humaines :

- Des fiches fonctions et des fiches de poste ont été mises en place. Les fiches d'habilitation et de maintien d'habilitation en découleront en 2016.

Maîtrise des achats :

- Les achats et/ou mises à disposition sont effectués par l'intermédiaire des services concernés des HUS, à savoir :
- La Direction des Equipements (DE) pour les équipements mobiliers et biomédicaux ainsi que les achats de consommables médicaux,
- La Direction des Achats et de la Logistique (DAL) pour les fournitures de bureau, les travaux d'imprimerie, etc., ...
- Le Centre de Ressources Informatiques Hospitalières (CRIH) : pour le matériel informatique.

Ces services se conforment aux obligations réglementaires du code des marchés publics.

- ▶ La sélection des fournisseurs est réalisée conjointement avec les services supports selon les critères prédéfinis.
- ▶ La gestion des stocks et la vérification des dates de péremption sont assurées par le personnel technique.
- ▶ L'évaluation des fournisseurs critiques est réalisée chaque année par le personnel du CNR.

Maîtrise des équipements :

- ▶ Certaines enceintes thermostatées du Plateau Technique de Microbiologie ont été cartographiées en 2014 et 2015, les autres le seront en 2016

Hygiène et sécurité :

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

Maîtrise des documents et de l'information :

- La mise à jour des modes opératoires se poursuit.
- La validation des systèmes informatiques a été mise en place.

Processus de réalisation

Accueil et prise en charge du patient :

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

Processus préanalytique :

1. Amélioration des procédures de réception, d'enregistrement et d'envoi des échantillons

biologiques mises en place en 2012 : réception et saisie informatique en temps réel d'un échantillon biologique pour analyse par culture et PCR, vérification de la saisie, procédure d'envoi de kits de prélèvement de biopsie cutanée pour analyse par culture, conditionnement pour envoi d'ADN, protocole de prélèvement pour recherche par PCR.

2. Poursuite de la rédaction et réactualisation des modes opératoires préanalytiques (cf : liste des fichiers informatiques « MOPE » du CNR *Borrelia*). Perspective de mise en place de l'édition d'un accusé de réception automatique quotidien des examens demandés au CNR en 2016 (via courrier de confirmation de réception : traçabilité, réponse préliminaire au prescripteur).

Processus analytique :

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

Processus postanalytique :

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

Prestation de conseil :

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

5. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

5.1 Procédures de respect de la conformité à la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractère personnel

Il existe au CHU de Strasbourg une politique de sécurité des systèmes d'information mise en œuvre au sein de la Direction des Systèmes d'Information (CRIH) et pilotée par un Responsable sécurité des systèmes d'Information. Cette politique stipule notamment que :

- ▶ le recueil et le traitement des données à caractère personnel doit être déclaré à la CNIL
- ▶ les données à caractère personnel et/ ou médical doivent être anonymisées par exemple dans le cadre des protocoles de recherches cliniques et autres détournements de finalité (tests et simulations)
- ▶ des mécanismes de contrôle d'accès et processus d'habilitation métiers sont mis en œuvre pour garantir la confidentialité des données

- ▶ il existe un certain nombre de mécanismes techniques visant à garantir une intégrité des données et un certain niveau de disponibilité et de traçabilité
- ▶ il existe un plan de formation et de sensibilisation des agents au respect de la législation sur les données à caractère personnel.

Pour le cas présent, les données demandées sont extraites du logiciel GLIMS (référence du dossier auprès de la CNIL : **1112934**) dont les principales conditions de sécurité sont décrites dans l'annexe « FicheIdentitéSI_GLIMS_140728jphbdctfs.xlsx », stockées en tant que fichier bureautique partagé dont les conditions de sécurité sont décrites dans l'annexe « Sécurité-Fichiers_bureautiques_partagés-v3.doc » et transmises ensuite par support USB sécurisé.

L'ensemble de ces mesures permet une sécurité des données de la source jusqu'au destinataire et ainsi le respect des conditions de la loi Informatique et Libertés. ».

5.2 Capacité du laboratoire à mettre en oeuvre une transmission régulière et informatisée de données vers l'InVS

L'activité du CNR *Borrelia* ne nécessite pas de transmission de données quotidiennes ou hebdomadaires vers l'InVS. Le CHU de Strasbourg ne disposant pas d'une messagerie sécurisée hors de son enceinte, le format choisi pour la transmission de données vers l'InVS est l'envoi en lettre suivie d'une clé USB cryptée comportant les données et l'envoi séparée d'un mail informant de l'envoi des données et comportant le code de la clé cryptée.

DONNEES DU CNR BORRELIA

Annexes

Définition de cas des manifestations cliniques de borréliose de Lyme en Europe (d'après les critères de l'EUCALB, <http://www.eucalb.com>)

Forme clinique	Critères cliniques nécessaires	Critères cliniques facultatifs	Critères biologiques nécessaires	Critères biologiques facultatifs
Erythème migrant	Macule extensive centrifuge rouge ou violette, s'éclaircissant souvent au centre, à bord typiquement plus marqué et peu surélevé	Antécédent de piqûre de tiques à cette localisation	Aucun	- Mise en évidence de <i>B. burgdorferi</i> par culture ou par PCR sur biopsie cutanée. - Séroconversion ou détection d'IgM spécifiques
Lymphocyto- me cutané bénin	Nodule ou plaque violacé, typiquement situé sur le lobe ou le pavillon de l'oreille, sur le mamelon ou sur le scrotum.	Plus fréquent chez les enfants. EM simultané ou antécédent d'EM.	Présence d'Ac spécifiques anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> (IgG et/ou IgM) ou augmentation du taux d'IgG spécifiques	- Histologie. - Mise en évidence de <i>B. burgdorferi</i> par culture ou par PCR sur biopsie cutanée.
Acrodermati- te chronique atrophiante	Lésions persistantes rouges ou violacées, situées typiquement sur les surfaces d'extension aux extrémités. Les lésions peuvent initialement être inflammatoires, puis devenir atrophiques. Les lésions peuvent s'indurer en regard de saillies osseuses.		Présence d'IgG spécifiques (habituellement à taux élevé)	- Histologie. - Mise en évidence de <i>B. burgdorferi</i> par culture ou par PCR sur biopsie cutanée
Neuroborrel- iose aiguë	Méningo-radculite douloureuse avec ou sans paralysie faciale ou parésie d'une autre paire cranienne. Chez les enfants, habituellement méningite ou paralysie faciale isolée (parfois bilatérale) ou parésie d'une autre paire cranienne.	EM simultané ou antécédent d'EM.	Mise en évidence d'une synthèse intra-thécale d'Ac spécifiques (peut manquer dans les formes très précoces)	- Lymphocytose dans le LCR (peut manquer dans les PF isolées ou dans les formes très précoces) - Présence d'IgG spécifiques dans le LCR. - Présence de bandes oligoclonales spécifiques dans le LCR. - Augmentation du taux sérique d'IgG spécifiques ou présence d'IgM spécifiques. - Mise en évidence dans le LCR de <i>B. burgdorferi</i> par culture ou par PCR
Neuroborrel- iose chronique	Encéphalite persistante, encéphalomyélite, méningo-encéphalite, radiculomyélite		Lymphocytose dans le LCR ET Mise en évidence d'une synthèse intra-thécale d'Ac spécifiques ET Présence d'IgG spécifiques dans le sérum	Présence de bandes oligoclonales spécifiques dans le LCR.
Arthrite de Lyme	Poussées brèves et récurrentes d'arthrite d'une ou deux grosses articulations. Evolution occasionnelle vers une arthrite chronique		Présence d'IgG sériques spécifiques (habituellement à taux élevé)	Mise en évidence de <i>B. burgdorferi</i> par culture ou par PCR sur biopsie et/ou liquide synovial
Atteinte cardiaque de la borréliose de Lyme	BAV (IIe ou IIIe degré), troubles du rythme, occasionnellement myocardite ou pancardite	EM simultané ou antécédent d'EM.	Présence d'IgG ET d'IgM spécifiques. OU augmentation significative du taux d'IgG spécifiques. OU diminution significative des IgG spécifiques après	Mise en évidence dans le LCR de <i>B. burgdorferi</i> par culture ou par PCR sur biopsie endomyocardique

			traitement (2 ^{ème} sérum ≥ 3 mois)	
--	--	--	---	--

DONNEES DU CNR BORRELIA

FICHE DE RENSEIGNEMENTS BORRELIOSÉ DE LYME

Médecin prescripteur :	Laboratoire :
Hôpital et service :	Biologiste :

Nature du prélèvement :	Date : /_/_/ /_/_/	Culture : <input type="checkbox"/>
Examen demandé : Sérodiagnostic : <input type="checkbox"/>	PCR <input type="checkbox"/>	

PATIENT: Nom :	Prénom :	Sexe : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> H
Date de naissance : /_/_/ /_/_/	Code postal du domicile : /_/_/_/	
Profession :		

FACTEURS DE RISQUE :
- Activités de loisirs : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, nature :
- Contacts avec des animaux ? <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, lesquels ? :
- Exposition aux tiques (fréquentation de milieux forestiers...) : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui
- Antécédents de piqûre de tique ? <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, <input type="checkbox"/> unique ou <input type="checkbox"/> multiple?
- <u>Antécédent</u> d'érythème migrant : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, constaté par un médecin <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
- Notion de piqûre de tique précédant l' <u>épisode actuel</u> : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui
Si oui, date de cette piqûre : /_/_/ /_/_/ /_/_/ Durée de l'attachement : <input type="checkbox"/> heures ou <input type="checkbox"/> jours
Sur quelle partie du corps :
Lieu de la piqûre (commune, forêt, vallée) :
Département : /_/_/

SYMPTOMATOLOGIE AU MOMENT DU DIAGNOSTIC : Date des premiers symptômes : /_/_/ /_/_/ /_/_/
Date du diagnostic : /_/_/ /_/_/ /_/_/
<input type="checkbox"/> Manifestations générales
<input type="checkbox"/> Syndrome algique <input type="checkbox"/> Syndrome fébrile : °C <input type="checkbox"/> Asthénie
<input type="checkbox"/> Manifestations cutanées
<input type="checkbox"/> Erythème migrant (> 5 cm) <input type="checkbox"/> Lymphocytome <input type="checkbox"/> Acrodermatite <input type="checkbox"/> Autre (à préciser) :
Localisation :
<input type="checkbox"/> Manifestations neurologiques
<input type="checkbox"/> Atteinte méningée : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, <input type="checkbox"/> atteinte clinique <input type="checkbox"/> uniquement biologique
<input type="checkbox"/> Atteinte périphérique :
Si oui, <input type="checkbox"/> Paralyse faciale <input type="checkbox"/> Radiculite Localisation :
<input type="checkbox"/> Atteinte d'une autre paire crânienne, si oui, laquelle :
<input type="checkbox"/> Atteinte centrale : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, laquelle :
CYTOLOGIE DU LCR : <input type="checkbox"/> Non faite <input type="checkbox"/> Si oui, date : /_/_/ /_/_/ /_/_/ <input type="checkbox"/> Lymphocytose :/ mm ³
<input type="checkbox"/> Manifestations articulaires Articulation(s) touchées(s) :
<input type="checkbox"/> Arthralgies seules <input type="checkbox"/> Arthrite aiguë <input type="checkbox"/> Arthrite chronique
<input type="checkbox"/> Mono-arthrite <input type="checkbox"/> Oligo-arthrite <input type="checkbox"/> Polyarthrite
<input type="checkbox"/> Autres manifestations (à préciser) : <input type="checkbox"/> Cardiaques <input type="checkbox"/> Oculaires :

Traitement antibiotique : <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui
Nature et posologie : du : /_/_/ /_/_/ /_/_/ au : /_/_/ /_/_/ /_/_/

Fiche à transmettre CNR des *Borrelia*