



HAL
open science

Intérêt de l'ELISA dans le diagnostic sérologique de la maladie de Lyme au stade cutané

Albert Hafota

► **To cite this version:**

Albert Hafota. Intérêt de l'ELISA dans le diagnostic sérologique de la maladie de Lyme au stade cutané. Sciences pharmaceutiques. 1991. dumas-03924519

HAL Id: dumas-03924519

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03924519>

Submitted on 5 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

1er exemplaire

Université Joseph Fourier - Grenoble I
U. F. R. de PHARMACIE

Domaine de la Merci
La Tronche

ANNEE 1991

N° D'ORDRE 7015

**Intérêt de l'ELISA dans le diagnostic sérologique
de la maladie de LYME au stade cutané**

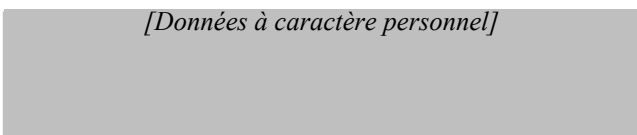
THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Mr. Albert HAFOTA

[Données à caractère personnel]



Cette thèse sera soutenue publiquement le 28 Mars 1991
devant la Commission d'Examen :

Madame le Professeur
Madame le Docteur
Monsieur le Docteur

R. GRILLOT, Président de Jury
B. GRATACAP
J.L. REYMOND



Université Joseph Fourier - Grenoble I
U. F. R. de PHARMACIE

Domaine de la Merci
La Tronche

ANNEE 1991

N° D'ORDRE:

**Intérêt de l'ELISA dans le diagnostic sérologique
de la maladie de LYME au stade cutané**

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Mr. Albert HAFOTA

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 28 Mars 1991
devant la Commission d'Examen :

Madame le Professeur

R. GRILLOT, Président de Jury

Madame le Docteur

B. GRATACAP

Monsieur le Docteur

J.L. REYMOND



115 006481 1

A mes parents

A notre président de Thèse

Madame le professeur R. GRILLOT

qui nous a fait l'honneur de présider notre jury, nous vous exprimons toute notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur J.L. REYMOND

qui nous a fait l'honneur de bien vouloir juger notre travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre respectueuse gratitude.

A notre Directeur de Thèse

Madame le Docteur B. GRATACAP

qui nous a conseillé et aidé tout au long de notre travail. Nous voudrions lui témoigner ici toute notre reconnaissance pour sa patience et sa bienveillance.

SOMMAIRE

SOMMAIRE**PREMIERE PARTIE**

INTRODUCTION	10
1 HISTORIQUE	11
2. EPIDEMIOLOGIE	15
3. ETUDE DE L'HOTE INTERMEDIAIRE ET VECTEUR	24
4. TRANSMISSION	30
5. ETUDE DE L'AGENT ETIOLOGIQUE	32
6. PHYSIOPATHOLOGIE	46
7. MANIFESTATIONS CLINIQUES	51
8. TRAITEMENT	61

DEUXIEME PARTIE**DIAGNOSTIC**

1. GENERALITES	71
2. DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE	72
3. CONCLUSION	94

TROISIEME PARTIE**INTERET DE L'ELISA (PLATELIA^R LYME)
DANS LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE DE LYME
AU STADE PRIMAIRE AU CHRU DE GRENOBLE**

1. RESULTATS ACTUELS DE LA SEROLOGIE A L'HOPITAL DE GRENOBLE	99
2. ETUDE DE CINQ PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE DE LYME EN PHASE PRIMAIRE	108
CONCLUSION	121
BIBLIOGRAPHIE	123

PREMIERE PARTIE

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION		10
1. HISTORIQUE		11
1.1. Circonstance de la découverte de la Maladie, aux USA		12
1.2. Découverte du vecteur de la maladie		13
1.3. Découverte de l'agent infectieux		14
2. EPIDEMIOLOGIE		15
2.1. Répartition géographique		15
2.1.1. Fonction du vecteur		15
2.1.1.1. <i>En Amérique du Nord</i>		15
2.1.1.2. <i>En Europe</i>		16
2.1.1.3. <i>En Afrique</i>		16
2.1.1.4. <i>En Australie</i>		19
2.1.1.5. <i>En Asie</i>		19
2.1.2. Fonction du climat et des variations saisonnières		19
2.1.3. Fonction du réservoir de germe		22
2.1.3.1. <i>Animaux sauvages</i>		22
2.1.3.2. <i>Animaux domestiques</i>		22
2.1.3.3. <i>La tique</i>		23
3. ETUDE DE L'HOTE INTERMEDIAIRE ET VECTEUR		24
3.1. Classification		24
3.2. Morphologie		25
3.3. Systématique		27

3.4.	Cycle de vie de la tique	27
4.	TRANSMISSION	30
4.1.	Contamination de la tique	30
4.2.	Contamination de l'hôte	31
4.2.1.	<i>A partir de la tique</i>	31
4.2.2.	<i>Par contact inter-hôte</i>	31
5.	ETUDE DE L'AGENT ETIOLOGIQUE	32
5.1.	Classification	33
5.1.1.	<i>Tableau de comparaison des % de C+G</i>	33
5.1.2.	<i>Etude de l'homologie des ADN</i>	34
5.2.	Morphologie	36
5.3.	Structure antigénique	41
5.3.1.	<i>Electrophorèse en gel de polyacrylamide</i>	41
5.3.2.	<i>Méthode immunologique utilisant les AC monoclonaux</i>	42
5.4.	Caractères cultureux	43
5.5.	Métabolisme	45
6.	PHYSIOPATHOLOGIE	46
6.1.	Rôle de l'immunité	47
6.1.1.	<i>Rôle des complexes immuns</i>	47
6.1.2.	<i>Rôle de l'interleukine</i>	48
6.2.	Rôle des milieux cultures	48

7. MANIFESTATIONS CLINIQUES	51
7.1. Phase primaire	51
7.1.1. Erythème chronique migrant	51
7.1.2. Autres manifestations cutanées	53
7.2. Phase primo-secondaire	53
7.3. Phase secondaire	54
7.3.1. Manifestations cutanées	55
7.3.2. Manifestations cardiaques	55
7.3.3. Manifestations neurologiques	56
7.3.3.1. Atteintes périphériques	56
7.3.3.2. Atteintes centrales	57
7.3.3.3. Atteinte méningée	57
7.3.4. Manifestations rhumatologiques	57
7.3.5. Manifestations oculaires	58
7.3.6. Manifestations hépatiques	58
7.4. Phase tertiaire	59
7.4.1. Manifestations cutanées tardives	59
7.4.2. Manifestations neurologiques tardives	60
7.4.3. Manifestations rhumatologiques tardives	60
8. TRAITEMENT	61
8.1. Prophylaxie	61
8.2. Traitement curatif	62
8.2.1. Phase primaire	65
8.2.2. Phase secondaire	65
8.2.3. Phase tertiaire	66
8.2.4. Place des corticoïdes	66



INTRODUCTION

La maladie de Lyme

On désigne par maladie de Lyme l'ensemble des manifestations cliniques dues à l'infestation par un spirochète *Borrelia burgdorferi*.

Il s'agit d'une véritable zoonose (31) à foyer naturel dont l'agent responsable *Borrelia burgdorferi* est transmis par morsure d'arthropode hématophage dont le principal est la tique.

La dénomination de maladie de Lyme (MdL) est originaire d'une petite ville des USA : Lyme dans le Connecticut où les premières observations américaines furent reconnues.

Il s'agit d'une entité médicale récente dont certaines manifestations cliniques sont connues depuis longtemps.

L'isolement en 1982 de la bactérie responsable a permis en unifiant les points de vues entre Européens et Américains d'orienter la recherche vers l'épidémiologie, la physiopathologie, la clinique, la thérapeutique et la biologie.

Actuellement nous sommes confrontés à des problèmes de diagnostic biologique notamment de mise au point de méthodes nouvelles sensibles et spécifiques.

Avant d'aborder ces différents problèmes, faisons un rappel historique permettant de faire le point sur nos connaissances.

1. HISTORIQUE

L'histoire de la MdL ainsi nommée par les Américains se décompose en plusieurs épisodes :

- en 1909 le médecin suédois Afzelius décrit pour la 1ère fois une lésion dermatologique particulière qu'il appelle Erythema Chronicum migrans (ECM) (1).
- en 1913 Lipschütz pose les critères cliniques de l'ECM et suppose le rôle vecteur des tiques (59).
- en 1922 Garin et Bujadoux en France, puis en 1941 Barnwarth en Allemagne décrivent des complications neurologiques chez des sujets atteints de ces ECM (38).
- en 1948 Lennhoff observe dans les lésions d'ECM des spirochètes (58).
- en 1950 Hollstrom traite avec réussite certains patients souffrant d'ECM avec de la pénicilline, mettant hors de cause les virus incriminés jusqu'alors (48).
- en 1955 Binder montre l'origine infectieuse de l'ECM (18).
- en 1970 Première observation d'ECM dans le Wisconsin ; mais, il s'agit d'un homme ayant effectué un séjour en zone rurale européenne (zone d'endémie).
- en 1977 Steere et ses collaborateurs publient la première description clinique de la maladie (91).

1.1. Circonstance de découverte de la maladie de Lyme aux USA (42)

En novembre 1975 deux mères dont les enfants souffraient de ce que l'on pensait être une arthrite juvénile alertèrent les services sanitaires du Connecticut précisant qu'en plus de leurs enfants, d'autres personnes adultes et enfants étaient atteintes des mêmes symptômes.

A Steere (94) jeune rhumatologue, après enquête épidémiologique, découvrit que :

- les cas étaient limités à trois communes adjacentes sur la rive est du Connecticut : Old Lyme, Lyme et Est Haddam ;
- la prévalence de la maladie étudiée dans les trois communes était nettement supérieure à celle de la polyarthrite rhumatoïde dans le reste du pays ;
- dans chaque commune, les cas étaient groupés.

A Old Lyme et Est Haddam, la moitié des malades vivait dans quatre rues seulement, où la prévalence de la maladie était 10000 fois supérieure à la prévalence normale de la polyarthrite rhumatoïde (42). Il ne s'agissait donc pas d'une forme habituelle de polyarthrite rhumatoïde.

A. Steere n'ayant pas beaucoup d'indices fit cependant plusieurs découvertes intéressantes.

Il observa que la maladie n'était pas contagieuse, que les symptômes apparaissaient entre juin et septembre et que les premières douleurs rhumatismales étaient souvent précédées d'une étrange éruption cutanée similaire chez tous les malades. La localisation de ces éruptions cutanées (sur la poitrine, l'abdomen, le dos et les fesses) conduisit A. Steere à penser que le

vecteur de la maladie était une araignée ou un insecte rampant. Mais, aucun patient ne se souvenait avoir été mordu.

Steere conclut qu'une nouvelle maladie était apparue probablement due à un virus et transmise par un arthropode non identifié (l'embranchement des arthropodes rassemble notamment les insectes, les arachnides et les acariens).

Il lui donna le nom d'arthrite de Lyme (42, 94).

Alors qu'il recherchait les causes de la maladie Steere découvrit que l'ECM transmis par la tique *Ixodes ricinus* décrit par Afzelius ressemblait beaucoup à l'éruption cutanée observée chez les personnes atteintes de MdL.

Comme l'ECM avait été traité avec succès par la pénicilline G, on savait que l'agent causal était une bactérie et non un virus.

1.2. Découverte du vecteur de la maladie (42)

En 1977, 9 personnes ayant contracté la MdL rapportèrent qu'elles avaient été mordues par des tiques à l'endroit où l'éruption cutanée était apparue. L'une d'entre elles conserva la tique et la remit à Steere. Celle-ci fut identifiée par Spielman (86) comme appartenant à l'espèce *Ixodes dammini* très voisine de *I. ricinus* responsable de la maladie en Europe. La preuve qu'*I. dammini* était bien le vecteur de la MdL fut faite quand les biologistes de l'université de Yale capturèrent des tiques *I. dammini* à l'endroit où avaient été déclarés des cas de maladie, c'est-à-dire sur la rive est près du village de Lyme, Old Lyme et Est Haddam.

Par la suite d'autres vecteurs comme *I. pacificus* ou *I. scapularis* furent découverts (4, 85).

1.3. Découverte de l'agent infectieux (31, 42)

Après avoir mis en évidence le rôle de la tique en tant que vecteur, restait à découvrir l'agent infectieux responsable de la MdL.

Ce fût l'oeuvre de William Burgdorfer, spécialiste des maladies transmises par les tiques (21).

Le service sanitaire de New-York eut l'idée, après qu'un cas mortel de fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses (dû à une rickettsie transmise par la tique du chien) est apparu sur la côte est du pays, de capturer les vecteurs de cette maladie (*Dermacentor variabilis*). Or ceux-ci, en cette saison d'automne, avaient disparu. L'équipe décida de rapporter des *I dammini*.

Burgdorfer (22) broya le tube digestif des tiques et découvrit au microscope à la place des rickettsies attendues des spirochètes de formes irrégulières.

Il fit alors le lien entre cette découverte, le fait que *I dammini* était le vecteur de la MdL et le fait que les spirochètes n'étaient pas les agents infectieux de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses.

De ce fait, il soupçonna ces bactéries d'être les agents de la MdL.

Par chance, A. Barbour (10) qui se trouvait également au laboratoire des Montagnes Rocheuses se mit à cultiver les spirochètes. Ceci permit à W. Burgdorfer de rechercher la présence d'Ac dirigés contre les spirochètes dans le sérum de malades New-Yorkais atteints de MdL. Il obtint des résultats positifs: ceci prouvait que les malades avaient bien été infestés par des spirochètes.

Dès lors, les progrès furent rapides. Pendant l'été 1982, les chercheurs de l'université de Yale isolèrent dans le sang, la peau et le LCR de malades, les mêmes spirochètes que ceux trouvés chez les tiques (16, 21).

A l'université du Minnesota, Russel Johnson et ses collaborateurs (78) étudièrent l'ADN de ces spirochètes et déterminèrent en 1984 qu'il s'agissait d'une nouvelle espèce appartenant au genre *Borrelia*.

Ils l'appelèrent *Borrelia burgdorferi* en l'honneur de W. Burgdorfer.

2. EPIDEMIOLOGIE

2.1. Répartition géographique de la maladie

La répartition géographique est fonction de différents facteurs (6, 65, 76) :

- l'aire de répartition des vecteurs et leurs variétés,
- les variations saisonnières. En effet, la charge parasitaire des hôtes présente de grandes fluctuations d'une année à l'autre et d'une saison à l'autre.
- les réservoirs de germes.

2.1.1. Fonction du vecteur

2.1.1.1. En Amérique du Nord

Quelques cas ont été rapportés au Canada. Mais, le foyer d'endémie le plus important se trouve aux U.S.A.

On observe que la distribution de la maladie suit la répartition des vecteurs (carte n° 1) (31, 34, 76, 80, 87).

I. dammini (23, 93) est le vecteur incriminé dans les régions côtières du Nord des USA, allant du Massachussets au Nord du Delaware incluant le New Jersey, le Connecticut, Rhode Island, la Pennsylvanie et New-York. On le retrouve également au nord dans le Wisconsin et le Minnesota.

I. pacificus est incriminé dans l'ouest, au niveau de la côte pacifique. C'est-à-dire dans les états de Washington, d'Oregon, de la Californie, du Nevada, d'Utah et d'Idaho aux USA ainsi que dans les régions côtières du British Columbia au Canada (29, 80, 87).

I scapularis est lui incriminé dans le golfe du Mexique, de la Floride, au Texas et au nord jusqu'au Kansas, Iowa, Ohio et Indiana (87).

2.1.1.2. *En Europe*

La répartition géographique de la maladie, depuis la Scandinavie au nord jusqu'à la péninsule Ibérique et l'Italie au sud, correspond à celle du vecteur *I ricinus* (31, 65, 76). Le nombre de cas recensés va de quelques unités à quelques milliers en fonction des pays.

En France, l'enquête de Dournon en 1986 (34) indique la présence de cas dans 66 départements et permet de penser que l'ensemble du Territoire métropolitain est concerné (carte n° 2) (34).

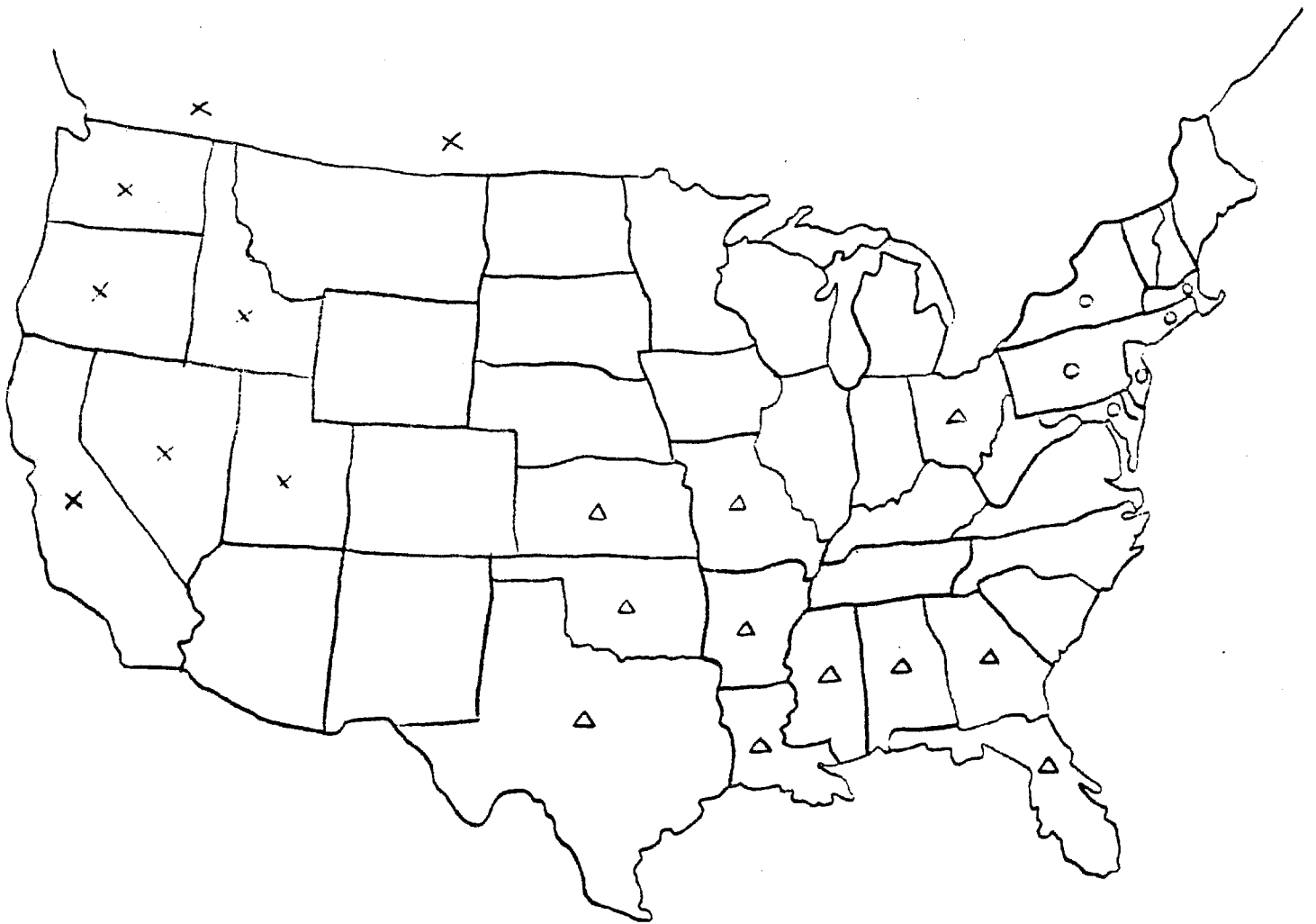
2.1.1.3. *En Afrique (76)*

Il semblerait que *I ricinus* soit également le vecteur responsable.

Dournon (34) rapporte en 1986 différents cas de MdL en Algérie où *I ricinus* est incriminé.

Becq et Girodon (15) publièrent le cas d'un homme originaire de Côte d'Ivoire hospitalisé pour bloc auriculoventriculaire dû à *Borrelia burgdorferi*.

Carte n° 1



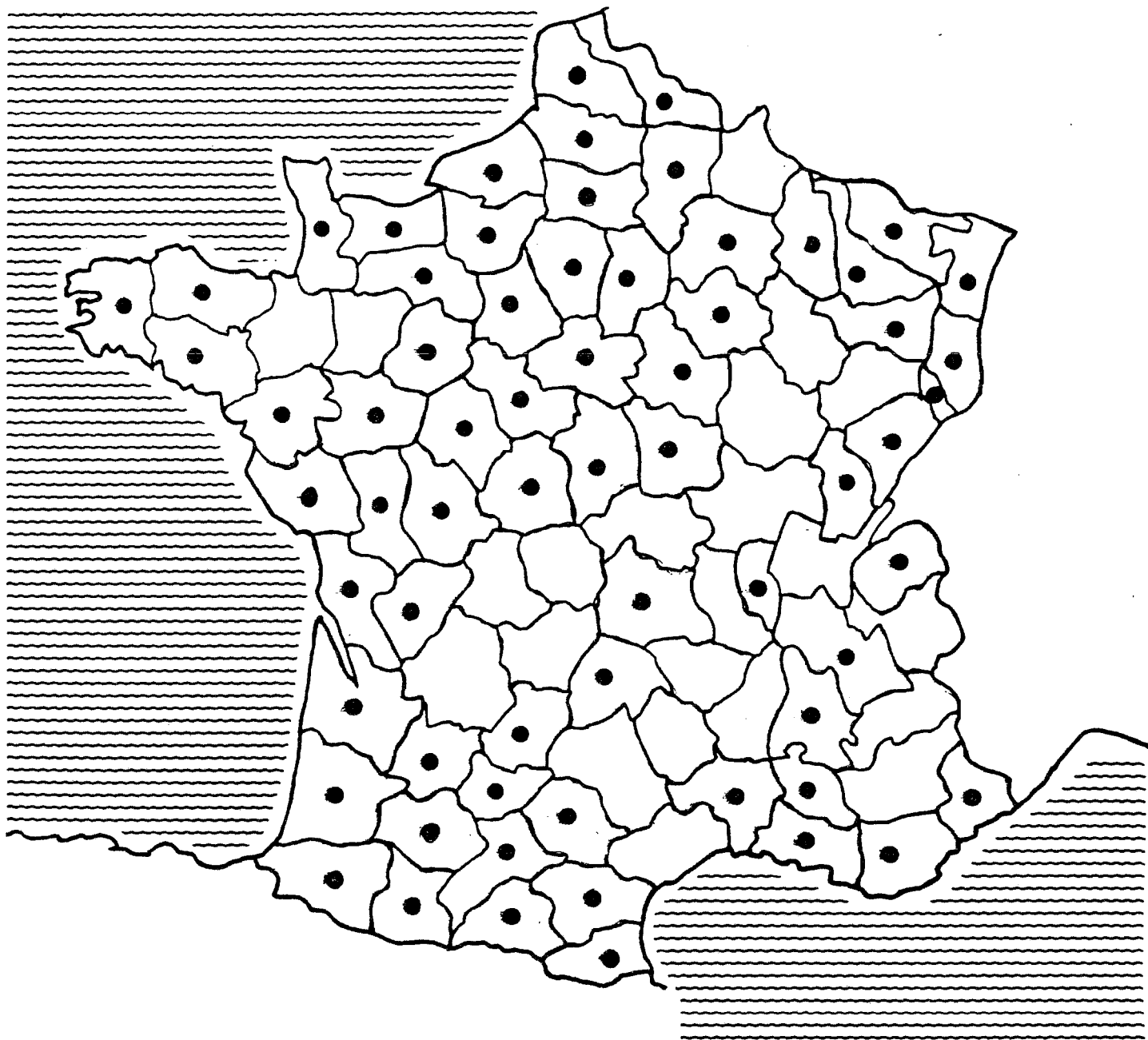
Répartition géographique aux USA de

I dammini 0

I pacificus X

I scapularis Δ

Carte n° 2



O: Départements Français dans lesquels les malades ont certainement été contaminés par *B burgdorferi*

(Série de l'hôpital Claude Bernard) (34)

2.1.1.4. En Australie (9)

Quelques cas de MdL ont été diagnostiqués sans que les tiques du groupe Ixodides n'aient été mis en cause.

GP Schmid conclut à l'existence probable d'un vecteur de la MdL autre que ceux déjà connus en Amérique du Nord ou en Europe.

2.1.1.5. En Asie (31)

Quelques cas ont été récemment diagnostiqué en URSS (Oural, Caucase, Sibérie) et en Chine.

2.1.2. Fonction du climat et des variations saisonnières

Les tiques sont des parasites obligatoires qui ne passent, en cumulant les périodes de fixation, que trois semaines sur l'hôte. Pendant ces phases parasitaires, le seul facteur qui joue un rôle est la température au niveau de la peau de l'hôte.

Pendant les phases où la tique n'est pas sur l'animal c'est-à-dire au sol ou sur la végétation, les facteurs climatiques ont une très grande importance. Deux paramètres conditionnent alors la survie de la tique : la température et le degré hygrométrique (31, 67).

La fréquence des infections au long de l'année est liée à la biologie des tiques vectrices.

L'activité de celles-ci tant en Europe qu'en Amérique du Nord est maximale pendant la période allant de la fin du printemps jusqu'au début de l'automne avec un pic d'apparition pour les nymphes et deux pour les adultes (Figure 4) (31, 42, 65, 75).

Les cas d'érythèmes migrants, manifestations précoces qui signent le début de l'infection, se répartissent donc de mai à octobre avec un maximum en juillet-août (figure 1) (34).

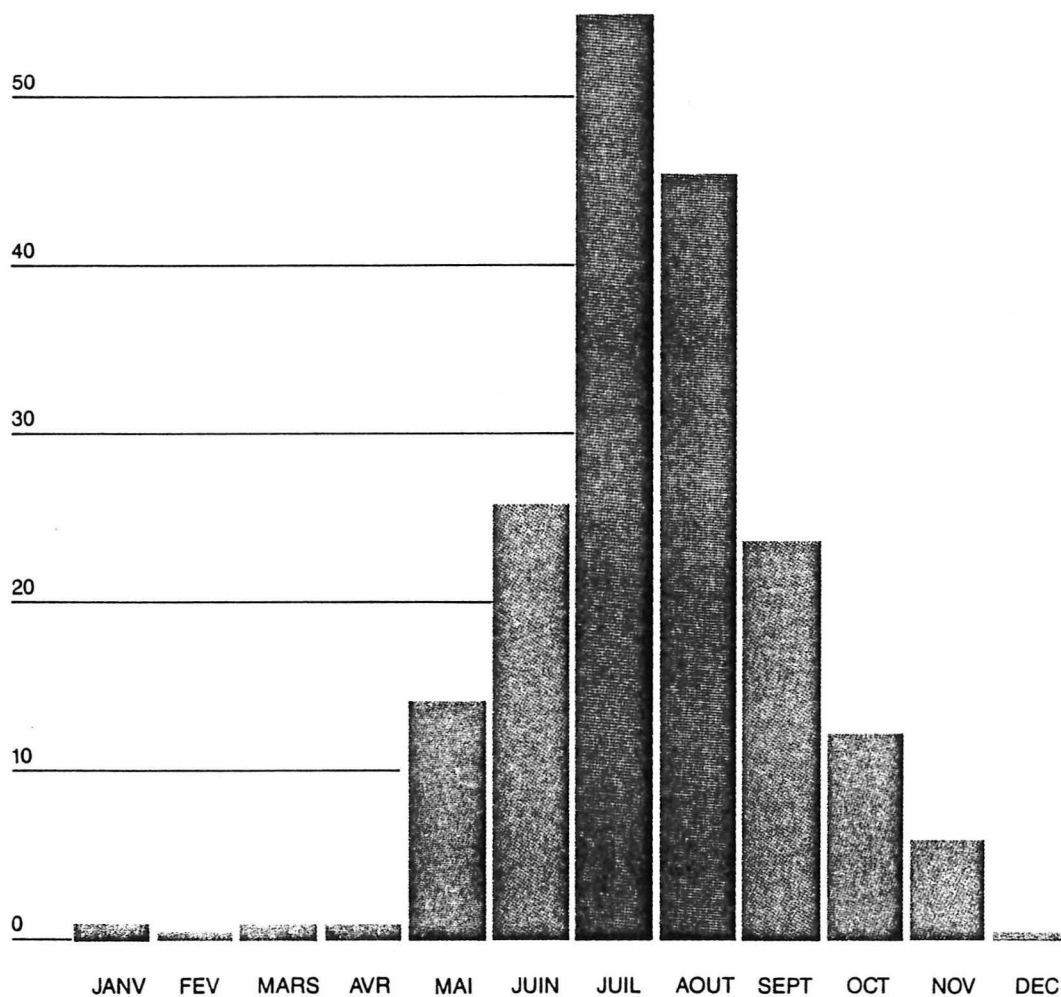
De même, concernant les manifestations secondaires (surtout neurologiques) une certaine relation entre fréquence et période d'apparition des cas peut être constatée.

En revanche, au sujet des manifestations tertiaires dont les délais d'apparition après piqûres infectantes peuvent être de plusieurs années, aucune relation ne peut être établie (31).

La fréquence des cas pourra également varier d'une année à l'autre dans une même région en fonction des conditions climatiques qui interviennent directement sur l'importance de la population d'arthropode vecteur. En effet, la tique très hygrophile ne supporte pas la sécheresse et ne survit que quelques jours si l'hygrométrie est inférieure à 70 %.

De même, l'altitude en modifiant les conditions climatiques (température et hygrométrie) provoque une diminution du taux d'infection de façon proportionnelle à l'élévation pour disparaître à 1500 m.

Ces conditions de vie font que la tique choisit comme habitat des zones humides : forêts, buissons, haies, bosquets, lisière de forêts, sous bois, litières de graminées dans les forêts. Elle sera absente des pâturages et champs à ciel ouvert (31, 76).



Distribution annuelle de la phase I de MdL en France

(180 cas) (Série H : Claude Bernard)

Figure 1 (34)

2.1.3. Fonction des réservoirs de germe

Toutes les espèces de vertébrés à sang chaud peuvent être théoriquement infectées dans la nature et en Laboratoire.

Dans la nature, l'infection est essentiellement conditionnée par la possibilité du contact avec l'arthropode. Compte tenu du caractère généralement forestier des biotopes de cette tique, le risque d'infection de l'animal sera d'autant plus élevé qu'il fréquentera davantage le milieu forestier (31, 65, 67).

2.1.3.1. Animaux sauvages

Des germes ont été isolés aux USA chez 3 espèces de cervidés, la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) et de façon moindre chez l'écureuil, le raton laveur, l'opossum et quelques oiseaux sauvages.

Dans plusieurs études américaines, on a pu mettre en corrélation l'importance des populations de cerfs, de tiques et la zone d'endémie (43, 89).

En Europe, les enquêtes sur la contamination des animaux sauvages ne font que commencer, seuls quelques rongeurs ont été sérologiquement testés en Bavière (31).

2.1.3.2. Animaux domestiques

Quant aux animaux domestiques de compagnie ou d'élevage, la fréquence de leurs infections est souvent fonction du risque encouru par la fréquentation de la forêt ou de zones bocagères.

Exemples :

- Les vétérinaires Nord Américains ont constaté que les chiens des zones infestées étaient contaminés dans des proportions élevées) 1 sur 4 dans la région de Lyme.
- Dans le Wisconsin (région à risque) on a montré la présence d'Ac anti *Borrelia burgdorferi* chez les bovins (ceci posant le problème du rôle du bétail dans la transmission à l'homme par la viande et le lait).
- D'autres enquêtes sérologiques en Europe et notamment en France, ont montré que, dans les régions à risque comme la Bretagne ou l'ouest, les taux d'infection étaient en relation directe avec les activités en extérieur de la population étudiée.

Ce type d'enquête sérologique, permettant de détecter le taux d'infestation, réalisé tant en Europe qu'aux USA a montré que beaucoup d'animaux contaminés étaient asymptomatiques (31, 67).

2.1.3.3. *La tique*

Comme nous l'avons dit précédemment, un grand nombre d'animaux vertébrés à sang chaud peut être considéré comme réservoir de germes. Mais, il semble pourtant que ce rôle de réservoir de germes soit surtout assuré par la tique elle-même.

3. ETUDE DE L'HOTE INTERMEDIAIRE ET VECTEUR

Dans les chapitres précédents nous avons montré l'interdépendance entre la maladie, son vecteur principal (la tique) et son environnement.

Nous nous proposons dans ce chapitre d'étudier plus en détail la tique.

3.1. Classification (37, 75)

Les acariens Ixodides connus sous le nom vulgaire de tique appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, ordres des Métastigmates.

On distingue alors :

- les Insectes : 3 paires de pattes, 2 paires d'ailes,
- les Myriapodes : nombreuses paires de pattes, pas d'ailes,
- les Arachnidés : 4 paires de pattes à l'âge adulte et pourvus de Chelicères.

Les Arachnidés sont eux-mêmes classés en trois groupes :

- Scorpions,
- Araignées,
- Acariens parmi lesquels seuls les Ixodides hématophages nous intéressent.

Classification des Ixodides : il existe environ 800 espèces

Les Ixodides se divisent en deux sous familles :

- Ixodines, caractérisés par :
 - . un rostre ventral

- . un écusson dorsal
- . des ambulacres aux pattes

- Argasinsés, caractérisés par :

- . un rostre ventral chez l'adulte
- . l'absence d'écusson dorsal et d'ambulacres (sauf chez les larves)

Ici, seuls les Ixodinsés nous intéressent, bien que les argasinsés puissent être également considérés comme des vecteurs potentiels.

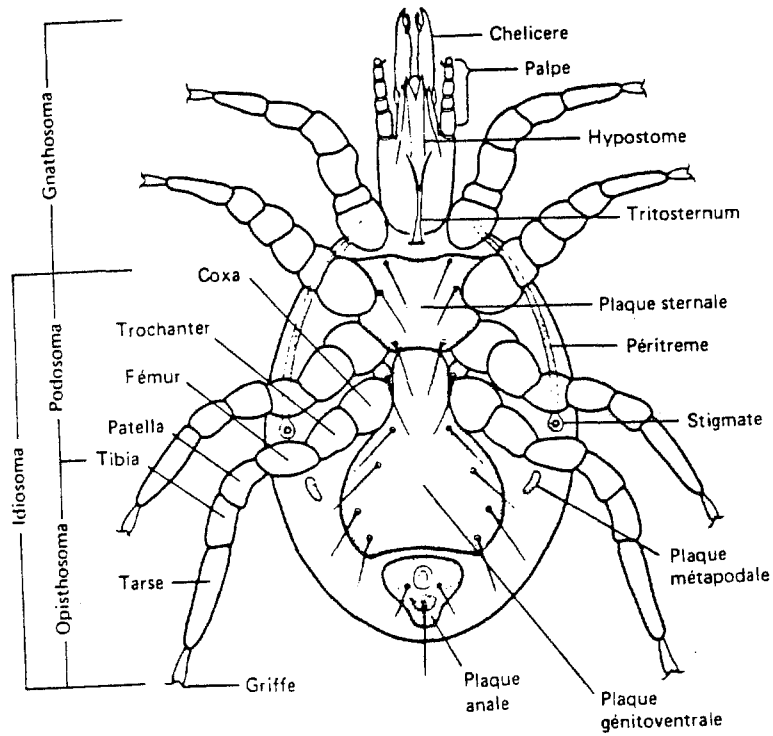
3.2. Morphologie

On observe (fig. 2 et 3) (75) :

- un corps ovalaire, globuleux sans segmentation extérieure formé de deux parties :
 - . à l'avant le capitulum ou gnathosome
 - . en arrière l'idiosome formé d'une cuticule souple et extensible permettant la réplétion.

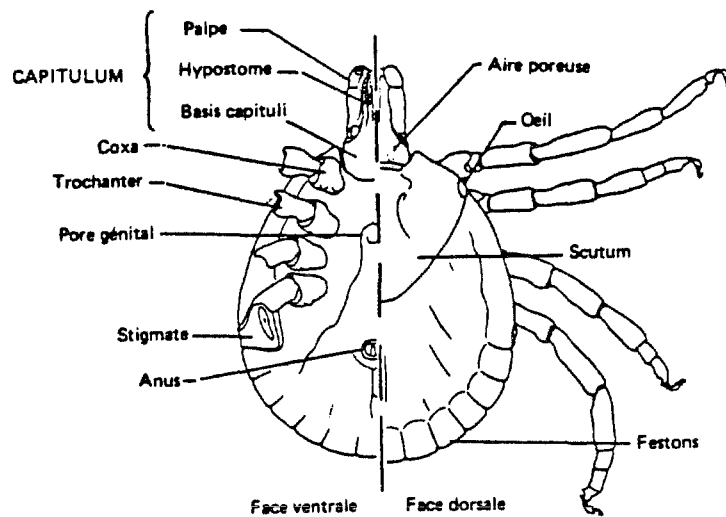
Cette partie du corps comporte des zones où le tégument est chitinisé dur (Scrutum dorsal).

- les pattes, formées de 6 segments :
 - . Coxa,
 - . Trochanter,
 - . Genua ou patelle,
 - . Tibia,
 - . Tarse, terminé par une ventouse dite pulville et deux griffes.



Morphologie générale schématique d'un acarien
(d'après CDC, 1966)

Figure 2 (75)



Morphologie générale schématique d'une tique ixodide (original)

Figure 3 (75)

Les adultes mâles et femelles ainsi que les nymphes ont 4 paires de pattes alors que les larves n'en n'ont que trois. La 1ère paire de pattes porte un organe sensoriel, l'organe de haller. Les mâles, femelles et nymphes ont une paire de stigmates en arrière de la 4ème paire de pattes.

- un anus postero ventral
- un orifice génital antéro-ventral.

3.3. Systématique

Nous ne la verrons pas en détail.

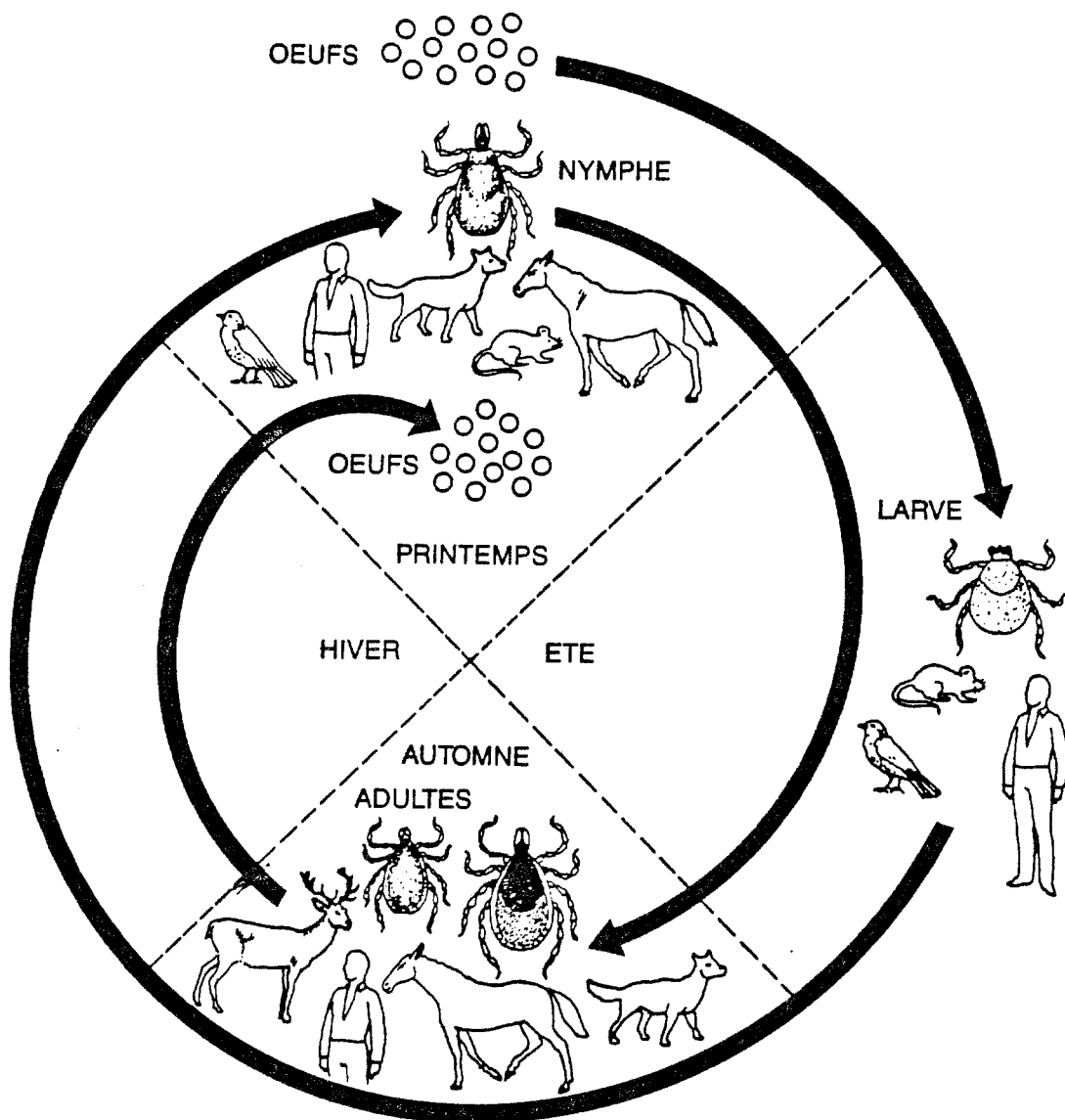
Succintement les éléments utilisés sont :

- le sillon perianal
- le capitulum ou rostre
- les yeux
- les articles du palpe
- le basis capituli
- le coxa de la patte 1 à épimère bifide.

Il convient de préciser qu'en plus de l'étude des structures morphologiques, la connaissance de l'hôte et de la localité de provenance sont indispensables à une bonne diagnose de la tique.

3.4. Le cycle de vie de la tique

Ex : cycle de *I. dammini* (figure 4) (42).



Le cycle de vie d'*Ixodes dammini*

Figure 4 (42)

Les tiques de cette famille sont des parasites obligatoires et temporaires. Leur cycle de développement dure deux ans et comporte en alternance des phases parasitaires sur les hôtes et des phases libres au sol.

La femelle pond ses oeufs au printemps. Ils sont pondus au sol dans un abri (crevasse, terrier, sous une pierre ...). L'incubation dure de 20 à 50 jours en fonction de l'espèce, de la température et de l'humidité.

L'éclosion des larves s'effectue environ un mois après la ponte. Pendant le premier été, les larves se nourrissent une fois seulement du sang d'un animal, le repas dure de 3 à 5 jours et représente 100 à 200 fois le poids de la larve à jeun. Le repas terminé, elle se laisse tomber au sol et passe à un état de repos qui coïncide avec le début de la saison froide.

Au printemps suivant, les larves de tiques muent et se transforment en nymphes. Les nymphes se fixent à leur tour sur un animal et se nourrissent de son sang pendant 3 à 4 jours. Elles prennent 20 à 80 fois leur poids. C'est à ce stade de leur cycle que les tiques mordent le plus souvent l'homme.

A la fin de l'été, les nymphes muent et se transforment en tiques adultes. On les trouve alors dans les broussailles, à un mètre environ au-dessus du sol où, elles peuvent facilement se fixer sur les gros mammifères. Comme les larves et les nymphes, les adultes parasitent de nombreuses espèces de mammifères. Dans le nord est des Etats Unis, elles parasitent surtout les cerfs (*Odocoileus virginianus*).

Les tiques adultes s'accouplent sur leur hôte peu après que la femelle s'y est fixée. Le repas de la femelle s'effectue après la fécondation et dure 5 à 10 jours puis, elle se laisse tomber au sol. Les mâles meurent après l'accouplement. Seules les femelles vivent un nouvel hiver.

Les oeufs sont pondus au printemps suivant et le cycle recommence (31, 42, 75).

4. TRANSMISSION

Nous avons vu qu'il existait de nombreux vecteurs :

- I ricinus
- I dammini
- I pacificus
- I scapularis

ainsi que *Amblyoma americanum*

Demacentor variabilis

Rhipicephalus sanguineus

Haemaphysalis leporispalustris

Certains *Aedes* dont *Aedes aegypti*

Certains Tabanides et Mouches (31, 76).

4.1. Contamination de la tique

Elle peut se produire :

- lors d'un repas de sang sur un hôte malade en phase de spirochètémie,
- de façon transplacentaire. Dans ce cas la contamination de la tique se fait au stade de l'oeuf par infestation de celui-ci à partir des tissus maternels (31, 69),
- par transmission d'un stade évolutif à l'autre, on observe que l'oeuf infesté peut donner naissance à une larve contaminée qui elle-même peut donner naissance à une nymphe contaminée, etc ... (69).

4.2. Contamination de l'hôte

4.2.1. A partir de la tique

L'hôte peut se contaminer par piqûres ou par contact avec la salive. La contamination n'est pas immédiate et demande pour se faire une fixation d'au moins 12 heures sur l'hôte (31, 76).

4.2.2. Par contact direct inter-hôte

En 1986 Burgess et ses collaborateurs font l'expérience suivante :

Ils contaminent expérimentalement des souris en leur inoculant des *Borrelia burgdorferi*. Toutes les souris développent alors des Ac. Ensuite, ils mettent en présence ces souris contaminées avec des souris de même espèce mais saines. Ils observent alors que les souris saines ont été contaminées et en déduisent donc la possibilité d'une transmission de *Borrelia burgdorferi* par contact direct. De même, récemment, aux USA, lors d'une enquête sur la fréquence de l'infection chez les bovins en zone d'endémie, les auteurs disent être persuadés de la possibilité d'une transmission directe d'un animal à l'autre.

Ceci n'a pas été repris chez l'homme, les seuls cas de contamination inter-humaine recensés sont dûs à une transmission transplacentaire du germe de la mère à l'enfant (90).

De plus, il semble probable même si cela n'a pas été rapporté, qu'une transfusion sanguine réalisée avec le sang d'un sujet en phase de parasitémie devrait permettre la transmission du germe.

5. ETUDE DE L'AGENT ETIOLOGIQUE

La distinction entre espèces est un problème en pleine évolution.

En effet, la taxonomie bactérienne obéit désormais à des règles strictes où le taxon de base (espèce) est individualisé sur des critères génomiques fixes (hybridation des ADN/ADN > 70 % avec stabilité thermique ($\Delta T_m \leq 5^\circ \text{C}$) (7, 99)). Les nouvelles méthodes de systématique ont confirmé les grandes lignes des classifications précédentes, et notamment que l'ordre des Spirochaetales était l'un des dix grand phyla des Eubactéries.

Mais, en raison des difficultés de culture in-vitro et de l'importance du travail à effectuer, les différentes espèces appartenant aux spirochètes n'ont généralement pas fait l'objet d'étude génomiques autorisant leur individualisation.

La classification utilisée actuellement et rapportée dans le Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology est donc encore basée sur des critères phénotypiques variés (morphologiques, épidémiologiques, sérologiques, etc ...).

Ainsi chez les *Borrelia*, l'individualisation d'une espèce se fait par l'association à l'espèce vectrice (57).

Or ce concept "un vecteur - une espèce" est en contradiction avec les constatations suivantes :

- l'adaptation parasite - vecteur est très étroite mais il est possible de la rompre expérimentalement,
- plusieurs espèces peuvent se cacher sous un même nom,
- une même espèce peut être transmise par différents vecteurs.

5.1. Classification (9, 57, 65, 90)

Les *Borrelia* sont des schizomycètes procaryotes de l'ordre des Spirochaetales, famille des Spirochetaceae (figure 5) (57).

L'appartenance du spirochète de la MdL au genre *Borrelia* est affirmée par l'analyse du contenu en guanine (G) + cytosine (C) et par l'étude de l'homologie de l'ADN.

5.1.1. Tableau de comparaison des % de C + G (50, 53)

Spirochètes	% de C + G
Spirochète responsable de la maladie de Lyme	27,7 à 30,5 %
<i>Borrelia hermsii</i> <i>Borrelia turicatae</i> <i>Borrelia parkeri</i>	28 à 30,5 %
Leptospire Tréponème	35,3 à 53 %

Les pourcentages C + G trouvés chez les *Borrelia* et chez les spirochètes responsables de la MdL sont très proches. Il faut cependant faire attention car la détermination du coefficient C+G ne permet en taxonomie que de séparer deux taxons (57).

Si deux valeurs sont identiques, la preuve que ces deux taxons descendent d'un ancêtre commun ne peut être apportée qu'en montrant que les séquences de

leur polynucléotides génomiques sont identiques ou très voisines et ce, dans des conditions bien définies de température, de longueur de chaîne, etc ...

5.1.2. Etude de l'homologie des ADN

En comparant l'ADN des borrelia trouvés chez I dammini, et dans d'autres espèces, des léptospires et des tréponèmes, avec l'ADN du spirochète responsable de la maladie. On observe les pourcentages d'homologie rapportés dans le tableau ci-dessous :

Espèces	% d'homologie observé avec le spirochète de la MdL
Borrelia de I dammini	76 à 100 %
Borrelia d'autres espèces	37 à 54 %
Léptospire et tréponème	0 à 2 %

Le spirochète responsable de la MdL montre un % d'homologie important, supérieur à 70 % avec la Borrelia de I dammini (50, 53).

Ces deux études ainsi que les critères morphologiques et physiologiques ont montré que le spirochète responsable de la MdL est une Borrelia (7).

Famille I. SPIROCHETACEAE :

- genres 1 - Spirochaeta N.P.
2 - Crisitipira N.P.
3 - Tréponéma P. N.P.
4 - Borrelia P.

Ordre SPIROCHAETALES

Famille II. LEPTOSPIRACEAE

- genre - Léptospira P. N.P.

P. = Pathogène

N.P. = Non pathogène

5.2. Morphologie

Il s'agit d'un spirochète dont les caractéristiques morphologiques sont celles d'une bactérie à structure helicoïdale souple de 0,2 à 0,3 μm de diamètre et de 4 à 30 μm de long (figure 6 et 7) (57).

Les spirochètes possèdent : (9, 57)

- une enveloppe élastique peu résistante de 10 à 12 nm d'épaisseur correspondant aux deux feuillets constitutifs de la membrane externe des Eubactéries gram < 0.

Cette enveloppe est composée (49) :

- . de lipides 40 %
- . de protéines 28 %
- . de polysides 24 %

En dessous de cette enveloppe, on observe au microscope électronique une couche rigide de péptidoglycane.

- un cylindre protoplasmique composé d'un contenu cytoplasmique, limité par une membrane associée sur la face externe au feuillet du péptidoglycane.

La morphologie helicoïdale du spirochète est assurée par ce péptidoglycane.

- un organe locomoteur interne.

Par sa morphologie et sa constitution chimique, cet organe locomoteur s'apparente aux flagelles bactériens.

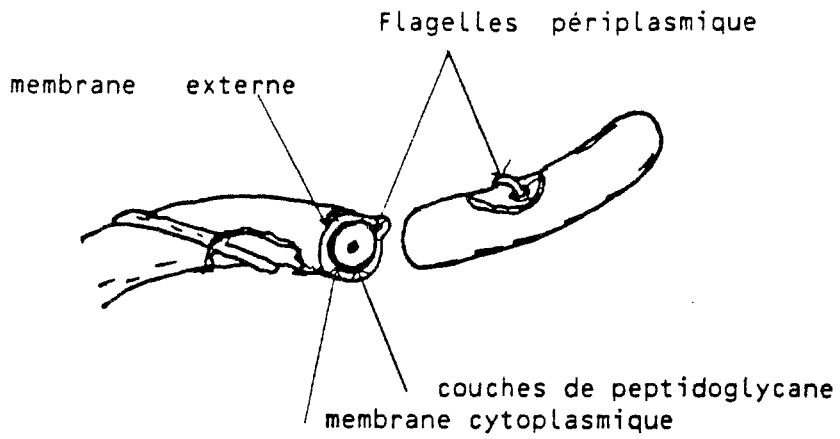
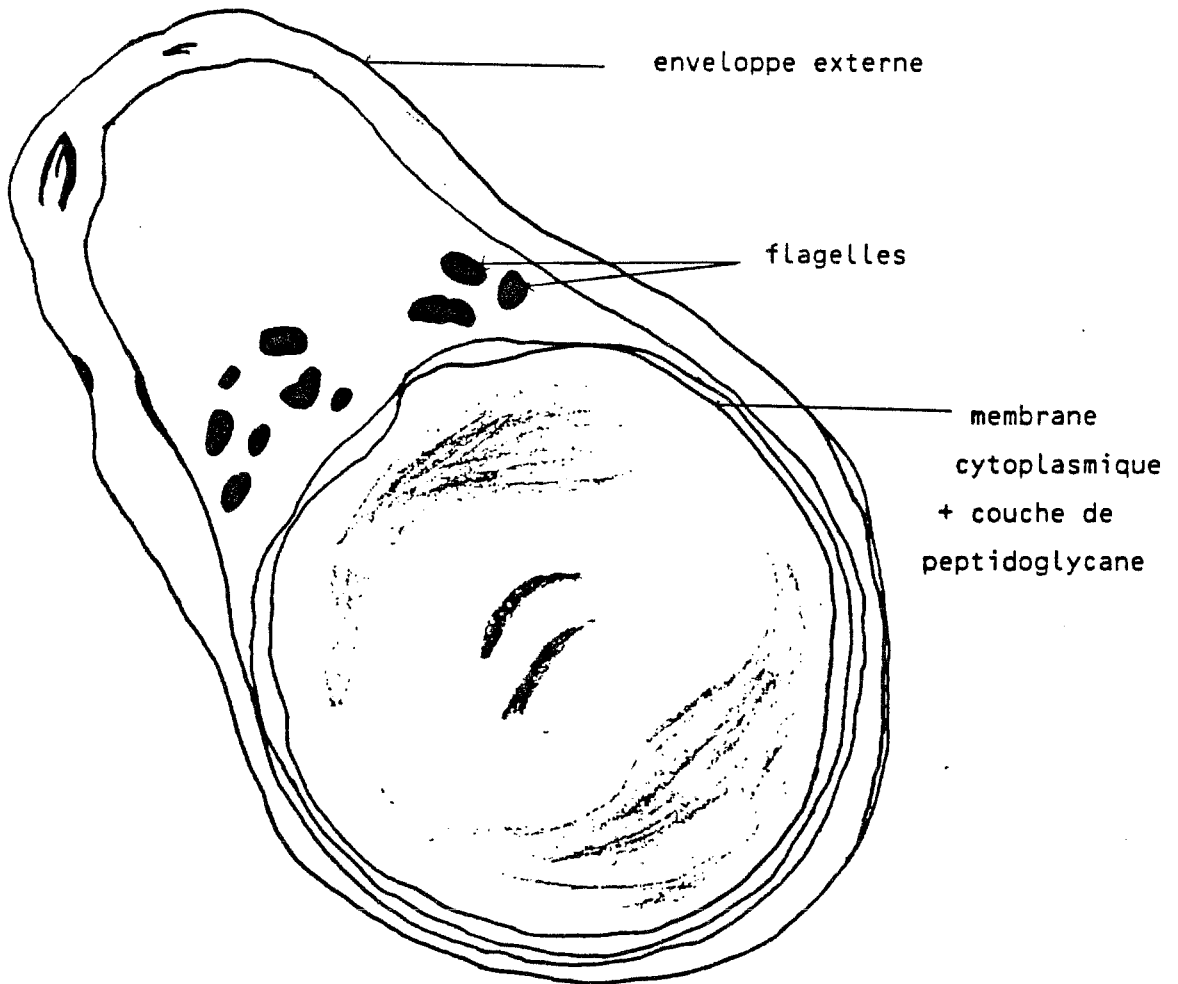


Schéma de Spirochète

Figure 6 (51)



Coupe transversale de *Borrelia burgdorferi*

Figure 7 (51)

La *Borrelia* possède de 7 à 11 flagelles qui s'insèrent à chaque extrémité du cylindre protoplasmique sur un corpuscule basal intracytoplasmique et qui cheminent entre la membrane cytoplasmique et l'enveloppe.

La *Borrelia* est donc animée de mouvements de rotation et de translation (90).

Description de *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi est une bactérie Gram < 0 . Elle se visualise bien au microscope à fond noir ou après coloration de Giemsa (57).

Hoving Hougen (49) a étudié la morphologie des spirochètes aussi bien d'origine américaine que suédoise, isolés d'une part de patients atteints de MdL et d'autre part de tiques.

Il fait les observations suivantes :

- les spirochètes isolés de tiques *I ricinus* (origine européenne) et ceux isolés de tiques *I dammini* (origine américaine) sont similaires mais non identiques (49).
- ils diffèrent par leur nombre de flagelles : la souche isolée de *I ricinus* en possède 8 ou 11, alors que celle isolée de *I dammini* en possède 7 ou 11 (figure 8 et 9) (51).
- tous les spirochètes d'une même origine géographique sont identiques.
- une tique peut héberger plusieurs spirochètes.
- une seule et même espèce est responsable de l'ensemble des différents stades cliniques de la maladie.

Souche	Origine de la souche	nombre de flagelle à chaque extrémité
G 74	Ixodes ricinus (Suède)	8 et 11
G 152	"	8
F 1	"	8
G 25	"	11
B 31	Ixodes dammini (U.S.A.)	7 et 11
ACA 1	lésion cutanée (Suède)	8
ECM A6	"	8
ECM A6	"	8
245	sang (U.S.A.)	7
272	lésion cutanée (U.S.A.)	7
297	LCR (U.S.A.)	7

Comparaison du nombre de flagelles chez *B. burgdorferi* en fonction de l'origine de la souche.

Figure 8 (51)

9a	SPIROCHETES ISOLES A PARTIR DE	NOMBRE DE FLAGELLES
	TIQUES	
	<i>Ixodes ricinus</i>	
	souche G 25	11
SUEDE	souche G 74	8 & 11
	souche G 125	8
	souche F 1	
	<i>Ixodes dammini</i>	
ETATS UNIS	souche B 31	7 & 11
	PATIENTS	
9b	La peau	
SUEDE	souche ACA* - 1	8
	souche ECMA**2	8
	souche ECMA - 6	8
	Sang	7
ETATS	Peau	7
UNIS	LCR***	7

*ACA : Acrodermatitis chronicum atrophicans

**ECM : Erythema chronicum migrans d'Azelius

***LCR : Liquide céphalorachidien

Nombre de flagelles des spirochètes responsables de la maladie de Lyme
observé en microscopie électronique

Figure 9 (51)

5.3. Structure antigénique

L'étude de la structure antigénique est une nécessité si l'on veut bien comprendre les problèmes qui se posent lors du diagnostic biologique.

De nombreuses études (9) ont permis de préciser les structures antigéniques de *B burgdorferi*.

On utilise notamment deux méthodes pour cette étude de structure (65).

5.3.1. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide

Cette méthode a permis :

- de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

Quelques protéines ont pu être analysées et définies par cette méthode :

- . la 31 Kda ou OSPA (outer surface protéine A) et la 34 Kda ou OSPB qui sont des protéines majeures de surface (12, 13, 90).
- . la protéine 41 Kda déterminée comme étant la protéine constitutive des flagelles. Cette méthode a permis de montrer que cette protéine était spécifique de genre et apparaissait souvent la première d'où son intérêt dans le diagnostic (26).
- . la protéine 60 Kda, très immunogène. Cette protéine présente des réactions antigéniques croisées avec des protéines existantes dans plus de 60 espèces bactériennes. Cette famille de protéines se définit comme un antigène commun de masse moléculaire comprise entre 58 et 65 Kda (65, 90).

- de montrer l'hétérogénéité des souches.

Un exemple nous est donné par l'étude en immunoblotting des protéines de surface qui diffèrent d'une souche à l'autre (65).

5.3.2. *La méthode immunologique utilisant des Ac monoclonaux*

Cette méthode a permis :

- de localiser les déterminants antigéniques

Exemple :

Pour montrer que les protéines de poids moléculaire 34 Kda sont bien situées en surface, on prépare un Ac monoclonal, l'Ac H6831 spécifique de la souche B31.

Dans un second temps, on utilise l'immunoélectromicroscopie utilisant des antiglobulines marquées à l'or colloïdal pour montrer que le déterminant antigénique qui fixe l'Ac H6831 se situe au niveau de la membrane externe de la *Borrelia* (9, 12, 13).

- de différencier les souches

Les résultats sont donnés par le tableau figure 10a (13)

"+" signifie qu'il y a une réaction Ag-Ac

"-" signifie qu'il n'y a pas de réaction Ag-Ac.

On observe :

- . qu'il existe des Ac spécifiques de genre. C'est le cas du H 9724 qui réagit avec toutes les souches de *Borrelia*.
- . qu'il existe des espèces différentes puisque H 6831 ne réagit qu'avec la souche B 31 des USA. H 6831 pourrait donc être un Ac spécifique d'espèce.
- . qu'il existe une différence de réaction entre les souches américaines marquées "+" et les souches suédoises marquées "-" avec l'Ac H₅T_S (figure 10b) (13).

En conclusion, la différence de poids moléculaire des protéines majeures de surface, et le comportement de celles-ci vis-à-vis des Ac monoclonaux, ont révélé l'hétérogénéité des souches.

Après ces études de structure, A. Barbour et ses collaborateurs (11, 12) ont émis l'hypothèse suivante.

La variation antigénique (phénomène d'échappement) pourrait expliquer en partie la chronicité de nombreux cas de MdL. Ils évoquent donc la possibilité d'un répertoire protéique extensif accessible aux spirochètes.

Ces propriétés permettraient l'invasion de tissus rapidement en contrecarrant l'élimination du spirochète par le système immunitaire.

Ce phénomène d'échappement typique des *Borrelia* n'a pas été démontré in-vivo pour *Borrelia burgdorferi* (9, 11, 12, 13).

5.4. Caractères cultureux

L'évolution des milieux de culture est fondamentale dans l'étude de la bactérie. Elle a permis d'obtenir le matériel nécessaire à la progression de la recherche.

Les exigences nutritives des *Borrelia* sont complexes et l'essentiel des milieux de culture est constitué par :

- un concentré pour culture (CMRL 1066) contenant des vitamines, des acides aminés et des facteurs de croissance.
- de l'albumine en quantité importante (Serum albumine bovine)
- de la N. acétyl glucosamine
- du glucose
- du citrate et bicarbonate de Na.

10a

SOUCHES ISOLEES A PARTIR DE		ANTICORPS MONOCLONAUX			
		H5332	H6831	H5TS	H9724
TIQUES					
Ixodes ricinus					
SUEDE	souche G25	+	-	-	+
	souche G74	+	-	-	+
	souche G152	+	-	-	+
	souche F1	-	-	-	+
Ixodes dammini					
ETATS UNIS	souche B31	+	+	-	+
10b PATIENTS					
Peau					
SUEDE	souche ACA-1	+	-	-	+
	souche ECMA-2	+	-	-	+
	souche ECMA-6	+	-	-	+
ETATS UNIS	Sang : souche 245	+	-	+	+
	Peau : souche 272	+	-	+	+
	LCR : souche 297	+	-	+	+

Résultats de la réaction des Ac monoclonaux avec les différents spirochètes de la maladie de Lyme par IFI

Figure 10 (13)

La croissance est favorisée par une certaine viscosité du milieu obtenue par l'incorporation de gélatine.

Le milieu le plus utilisé est celui de Kelly milieu Barbour-Steere et Kelly (10, 46, 65). Le milieu BSK₁ très utilisé a été amélioré par la délétion de glutamine du CMRL et par l'adjonction de 2 gr de Yeastolate (10) pour donner le milieu BSK₂.

La culture des *Borrelia* exige, de grandes précautions d'asepsie. Pour éviter les contaminations, on ajoute des antibiotiques auxquels le germe est résistant : fosfomycine, kanamycine, rifampicine.

L'ensemencement du milieu se fait en surface des tubes de culture, en évitant de laisser un trop grand volume mort.

La surveillance de la croissance qui dure de 3 à 4 semaines se fait au microscope à fond noir.

Le germe ensemencé est issu de la souche B31 : spirochète transmis par *I dammini* isolé à Shelter Island, cloné en milieu de Kelly enrichi.

Ce clone constitue la souche de référence. La culture de *B burgdorferi* pose donc de nombreux problèmes et particulièrement lors du diagnostic direct. (La culture de *B burgdorferi* à partir d'un produit pathologique ou d'une biopsie est délicate et rarement réussie).

5.5. Métabolisme (19, 57)

- les *Borrelia* sont microaérophiles,
- catalase "-", peroxydase "-",
- les amino acides et les sucres constituent les sources azotées et carbonées,

- les lipides, acides gras à longue chaîne saturée et insaturée sont des facteurs essentiels de croissance. Alors que les lipides complexes sont peu ou pas catalisés,
- l'énergie est fournie par la fermentation des sucres, notamment du glucose,
- le principal produit de dégradation est l'acide lactique.

6. **PHYSIOPATHOLOGIE**

Elle n'est encore qu'imparfaitement connue. Cependant, comme la syphilis, la MdL peut être divisée en 3 phases successives :

- La phase primaire, localisée au point d'inoculation au niveau duquel le germe peut être mis en évidence.
- La phase secondaire dont les manifestations sont dues, à la dissémination septicémique.
- La phase tertiaire définie par la présence de manifestations chroniques.

La présence du germe est démontrée à tous les stades. Cependant, le très petit nombre de spirochètes présents dans les organes suggère qu'une partie des symptômes de la maladie est sous la dépendance de phénomènes inflammatoires et immuns.

Il faut souligner que l'infection de l'hôte est facilitée au stade initial par les composants salivaires des tiques ayant des propriétés anti-hémostatiques, anti-inflammatoires et immuno-suppressives.

Ces facteurs favorisant le repas sanguin et l'attachement de la tique, permettent également l'adaptation initiale et la dissémination du spirochète en inhibant l'activation des macrophages et des neutrophiles.

L'étude du rôle de l'immunité à médiation cellulaire dans les infections à *Borrelia burgdorferi* devrait permettre une meilleure compréhension de la maladie et de ses développements. *B. burgdorferi* peut adhérer aux macrophages et aux polynucléaires grâce à des sites de fixation spécifiques.

Les composants de surface du spirochète entier stimuleraient les lymphocytes T au site de l'infection. Après quelques semaines l'activité des lymphocytes T diminuerait et on noterait une hyperactivité des lymphocytes B avec une sécrétion d'immunoglobulines (65).

6.1. Rôle de l'immunité

Différentes théories tentent d'expliquer le rôle joué par cette immunité dans l'apparition des symptômes (42).

6.1.1. Rôle des complexes immuns

Les complexes immuns formés d'antigènes de spirochètes, d'Ac et de fractions du complément sérique humain, s'accumuleraient dans les articulations.

Cette accumulation attirerait les neutrophiles qui libèrerait de nombreuses enzymes dirigées contre ces complexes communs.

Ces enzymes libérées seraient responsables des symptômes articulaires.

6.1.2. Rôle de l'interleukine

On a mis en évidence chez *Borrelia burgdorferi* une activité "endotoxine like". Cette découverte correspond à la mise à jour d'un lipopolysaccharide (LPS) très proche de celui rencontré dans la paroi externe des bactéries Gram "-".

Le LPS serait un puissant inducteur de la libération de l'interleukine 1 produite par les leucocytes.

L'interleukine 1 (figure 11) (42) est une protéine de masse moléculaire 17 000. Elle intervient comme régulateur de la réaction immunitaire, agissant comme un chef d'orchestre moléculaire, dirigeant les mécanismes non spécifiques de défense contre de nombreuses agressions de l'environnement.

L'interleukine 1 participe aux réactions infectieuses de l'organisme et aux traumatismes, en faisant apparaître des symptômes comme l'éruption, la fièvre et l'arthrite.

6.2. Rôle du milieu de culture

L'étude des milieux de culture a également permis de montrer :

- que la perte du pouvoir infectieux coïncide avec la perte de l'expression d'une protéine de surface OSPB de 34 Kda. Ceci s'observe lors de subcultures répétées (16, 65).

- que la pathogénicité pourrait être due à des plasmides de 7,6 et 27 Kda, circulaires, capables de coder des facteurs de pathogénicité (19, 81).

D'autre part Craft montre que les protéines antigéniques apparaissent graduellement dans l'organisme au cours de la maladie sans que l'on puisse les mettre en relation directe avec des signes cliniques donnés (34).

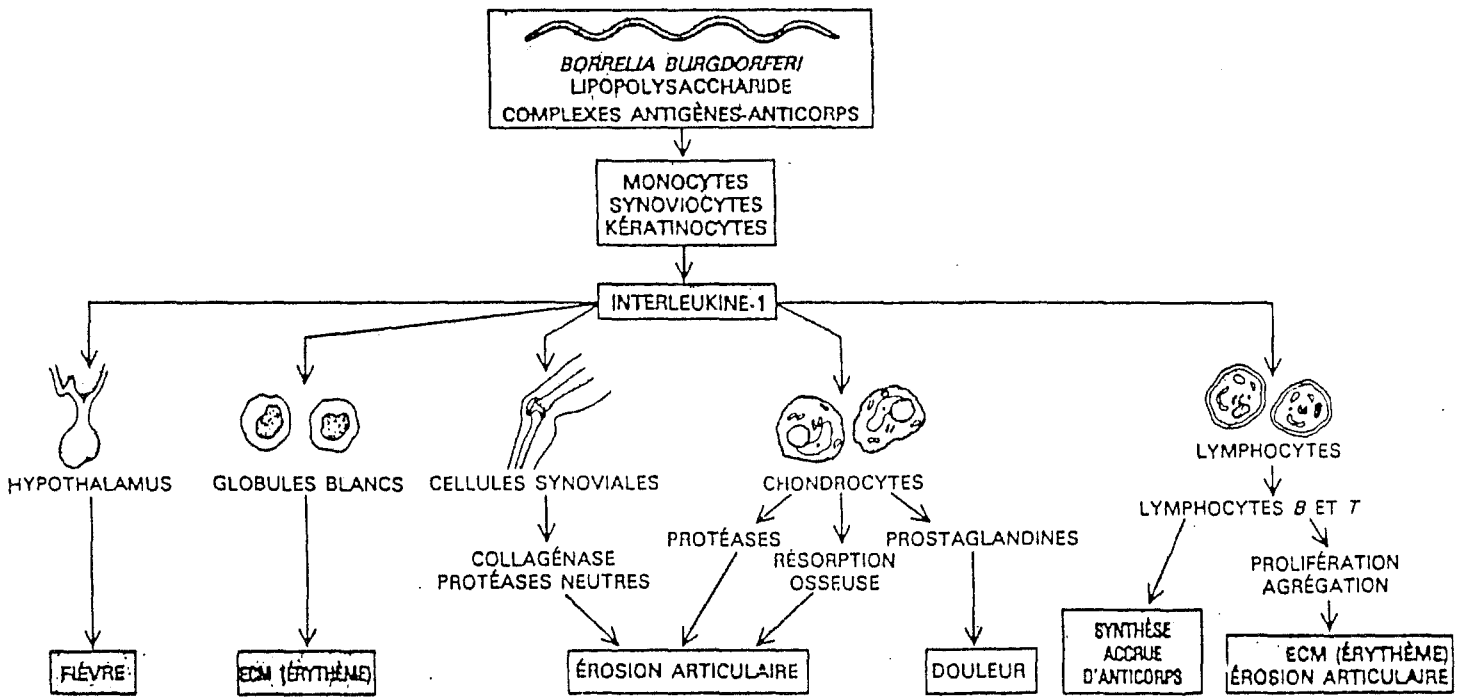


Figure 11 (42)

7. MANIFESTATION CLINIQUE

La maladie de Lyme est classée parmi les maladies nouvelles au même titre que la maladie des Légionnaires et le SIDA.

Pourtant la première description d'ECM, manifestation initiale de la maladie consécutive à une morsure de tique a été donnée il y a 80 ans par Afzelius.

Par analogie avec la syphilis, dont l'agent infectieux est une spirochète, on décrit souvent la borreliose de Lyme en stade primaire, secondaire et tertiaire (6, 34).

7.1. Phase primaire

Elle correspond aux manifestations cutanées précoces, localisées au site d'inoculation du germe (2, 6, 29, 90, 97).

7.1.1. *L'erythème chronique migrant (ECM)*

L'ECM décrit par Afzelius et Lipschutz, est un signe essentiel par sa fréquence, sa chronologie et son rôle dans le diagnostic.

Ce signe apparaît en moyenne de 8 à 20 jours après la piqûre quand celle-ci a été établie. En effet, la relation avec une morsure de tique n'est pas toujours clairement établie.

L'ECM est une lésion annulaire extensive inflammatoire (en cocarde) ayant la forme d'un placard cutané rouge centré par la piqûre.

La lésion initiale est une petite macule rouge et arrondie, ou parfois une papule légèrement infiltrée.

On observe une extension centrifuge évoluant vers la constitution d'un anneau rouge rosé dont le diamètre s'accroît progressivement tandis que typiquement le centre s'éclaircit, la peau retrouvant alors un aspect sensiblement normal.

Les bords de l'anneau de 0,5 à 2 cm de large sont en général bien limités, parfois discrètement en relief.

Le point de morsure est parfois induré, nécrotique et peut persister quelques semaines. Le rostre de la tique peut y subsister lorsque celle-ci a été maladroitement enlevée.

L'ensemble de la lésion a alors un aspect en cocarde. L'extension de l'érythème peut être progressive (3 à 5 cm par semaine) ou se faire par poussées successives. Dans les formes habituelles, le diamètre de la lésion atteint 10 à 20 cm.

Des lésions beaucoup plus étendues ont été décrites, jusqu'à 60 cm de diamètre. Dans de telle forme, l'anneau peut se disloquer et chacun de ses fragments migrer indépendamment.

Il n'est pas exceptionnel, en particulier lorsque la lésion est vue tôt, que son aspect soit moins évocateur.

Elle peut notamment rester uniformément érythémateuse, sans décoloration du centre, avoir une extension centrifuge modeste, être infiltrée ou recouverte de squames fines.

Cette lésion peut siéger sur n'importe quelle région du corps y compris la face ; toutefois cuisses, creux inguinaux, fesses et aisselles sont les plus fréquemment atteints (65).

En général, asymptomatique, l'ECM peut provoquer une sensation de prurit, de brûlure, de douleur diffuse. Il peut s'accompagner d'un syndrome pseudo grippal avec malaises, asthénies, céphalées, fièvre, arthralgies et adénopathies.

La venue de manifestations systémiques dans un délai variable après l'apparition de l'ECM est probablement contemporaine de la dissémination sépticémique de la *Borrelia*.

Non traité cette ECM évolue le plus souvent vers une guérison spontanée en un mois.

Cette guérison est trompeuse car le malade reste exposé à la venue de manifestations secondaires et tertiaires.

Traitée, la lésion pâlit en quelques jours et disparaît en moins d'une semaine. Il arrive cependant que la peau reste pigmentée pendant quelques semaines après la guérison (29, 34, 65, 97).

7.1.2. *Autres manifestations cutanées*

Quelques cas de lymphocytomes cutanés bénins ont été observés, sans qu'il soit possible de les attribuer de façon certaine à la *Borrelia burgdorferi* (85).

7.2. *Phase primo secondaire*

Souvent intégrée dans la phase primaire, elle correspond à la période où apparaissent les premières manifestations systémiques dues à la dissémination du germe :

- asthénie
- anorexie
- malaise général
- fièvre
- diverses algies
- adénopathies généralisées
- Splénomégalie
- érythème pharyngé et/ou conjonctivite.

L'existence chez certains malades, de céphalées, photophobies, nausées, vomissements et parfois de risques mineurs d'atteintes encéphaliques (trouble de la mémoire, du sommeil, de l'humeur) sont compatibles avec un ensemencement précoce du système nerveux central (34, 65, 97).

7.3. Phase secondaire

Cette phase peut apparaître des semaines voire des mois après le début de l'ECM. Elle peut révéler la maladie lorsque l'érythème a manqué ou a été négligé. Ses manifestations sont dominées par des problèmes cardiaques et surtout neuro-méningés.

Il est indispensable que les généralistes devant certaines manifestations neurologiques ou rhumatologiques, évoquent la maladie car ces symptômes sont directement liés à la *Borrelia* et à ce titre, justifie d'une antibiothérapie (97).

7.3.1. *Manifestations cutanées*

Il s'agit d'un érythème migrateur multiple avec des lésions (15 à 20) extensives, touchant à l'ensemble du corps, évoluant par poussées durant plusieurs mois.

Ces manifestations peuvent persister quelques années mais en règle général, l'évolution se fait vers une guérison spontanée en quelques semaines.

En l'absence de traitement, le malade reste exposé à la venue d'autres manifestations systémiques de la maladie.

Ces manifestations sont fréquentes aux USA et semblent rares en Europe (29, 34, 84, 27).

7.3.2. *Manifestations cardiaques*

Rares mais non exceptionnelles en Europe, elles interviennent de 3 à 6 mois après la morsure et sont presque toujours observées entre la fin du printemps et la fin de l'automne.

Elles doivent être connues car la MdL est certainement une cause non négligeable de péricardite et de trouble de la conduction (bloc auriculo-ventriculaire, bloc intraventriculaire, bloc sinoauriculaire).

On observe également des myocardites vues à l'ECG en particulier chez les patients atteints d'autres manifestations viscérales (34, 65, 97).

7.3.3. *Manifestations neurologiques*

C'est le mode de révélation de la phase secondaire le plus fréquent du moins en Europe (34, 56, 65, 97). On distingue :

7.3.3.1. *Les atteintes périphériques*

- Atteintes radiculaires à prédominance sensitive.

Ce sont les plus fréquentes. Les douleurs sont souvent très violentes et débutent dans le territoire de la morsure 15 à 45 jours après.

Ces douleurs sont insensibles aux antalgiques et aux anti-inflammatoires.

Par contre, les traitements antibiotiques sont rapidement efficaces, ce qui constitue à posteriori un excellent argument de diagnostic.

- Atteintes motrices périphériques

Elles sont plus rares que les précédentes mais ne sont pas à négliger.

Elles donnent des paralysies asymétriques et persistent quelques semaines. Elles sont moins sensibles aux antibiotiques.

- Atteintes des nerfs crâniens

Elles sont assez fréquentes et consistent, dans la majorité des cas, en une paralysie faciale périphérique uni ou bilatérale.

L'atteinte des autres nerfs crâniens est possible.

La guérison qui semble accélérée par une antibiothérapie n'est pas toujours complète et des séquelles peuvent subsister (97).

7.3.3.2. *Les atteintes centrales*

Assez fréquentes, elles traduisent une atteinte médullaire ou encéphalique avec en général des signes mineurs.

Le tableau habituel est celui d'une encéphalomyélite ou d'une myélite posant des problèmes de diagnostic avec une sclérose en plaque.

Cependant il existe aussi des observations avec atteintes plus graves : convulsions, déficit moteur, ataxie.

Le traitement antibiotique précoce avec des produits à bonne diffusion neuroméningée est efficace.

7.3.3.3. *L'atteinte méningée*

Elle s'observe dans toutes les atteintes neurologiques et sa mise en évidence constitue un argument majeur en faveur du diagnostic.

Habituellement latente ou limitée à des céphalées dans son expression clinique, la méningite est souvent une découverte de la ponction lombaire.

Un traitement antibiotique adapté évite à la méningite de persister des semaines ou des mois.

7.3.4. *Manifestations rhumatologiques*

Elles sont à l'origine de la description de l'arthrite de Lyme et sont apparamment plus fréquentes aux USA qu'en Europe.

Les artralgies sont précoces, migratrices, polyarticulaires, et associées à des myalgies, elles durent quelques jours.

Les arthrites sont plus tardives ; il s'agit d'oligoarthrites asymétriques récidivantes, durant plusieurs semaines.

Elles touchent genoux, chevilles, épaules et poignets.

Les patients ont plusieurs poussées, souvent séparées par des rémissions de plusieurs semaines.

Le passage à la chronicité en l'absence de traitement s'observe dans 10 % des cas, alors que le traitement à ce stade est efficace (2, 34, 65, 97).

7.3.5. Manifestations oculaires

Des conjonctivites ont été signalées et surtout des uveïtes dont le traitement antibiotique est difficile si elles sont liées directement au germe.

On observe également la paralysie du nerf occulo-moteur, des névrites optiques, des anomalies secondaires dues à une hypertension intracrânienne, ou aux complications oculaires des paralysies faciales (34).

7.3.6. Manifestations hépatiques

Steere (88) a signalé chez 19 % des malades de son étude une augmentation modérée des Transaminases hépatiques pendant les phases primo secondaires et secondaires.

Ces observations nous amènent à la conclusion suivante. La phase secondaire est riche de manifestations probablement liées en partie à la dissémination du germe

et à son rôle pathogène direct (coeur, oeil, système nerveux, articulations, foie) et en partie sans doute à des phénomènes immunologiques.

7.4. Phase tertiaire

A ce stade, les manifestations sont définies par leur chronicité, elles apparaissent dans les mois ou les années qui suivent la contamination.

Elles succèdent à des phases primaires ou secondaires insuffisamment ou non traitées.

Il convient de souligner les faits suivant :

- la fréquence des manifestations tertiaires n'est que peu ou pas connue.
- les manifestations ne sont pas spécifiques en dehors de l'acrodématite atrophiante d'où la difficulté à établir ces diagnostics de phase tertiaire avec certitude.

Ce diagnostic repose donc sur un ensemble d'arguments anamnestiques (notions de morsure de tique, de phase primaire ou secondaire), cliniques, biologiques et éventuellement, sur le traitement si celui-ci est suivi d'une amélioration franche.

7.4.1. *Manifestations cutanées tardives*

La seule manifestation dermatologique spécifique de MdL est la maladie de Pick-Herxheimer ou acrodématite chronique atrophiante (ACA).

On observe une amélioration progressive de la lésion sous antibiotique.

On observe d'autres manifestations cutanées comme le lymphocytome cutané bénin où la responsabilité exclusive de MdL n'est pas formelle, et certaines morphées qui seraient pour quelques auteurs des manifestations tardives de MdL (29, 34, 85, 37).

7.4.2. *Manifestations neurologiques tardives*

La limite entre forme secondaire et tertiaire est délicate et le délai d'apparition des manifestations neurologiques tertiaires varie de plusieurs mois à plusieurs années après l'inoculation.

Les atteintes neurologiques peuvent être cérébrales, médullaires ou cérébro-médullaires.

A ces lésions, s'associe souvent une méningite lymphocytaire chronique asymptomatique.

Les lésions observées ont été confirmées par tomодensitométrie et RMN.

Le traitement antibiotique, en raison de la multiplicité des atteintes possibles, a une efficacité relative (34, 56, 65, 97).

7.4.3. *Manifestations rhumatologiques tardives*

Elles sont définies comme des arthrites évoluant de manière constante pendant plus d'un an avec atteinte synoviale.

Ces arthrites chroniques sont d'origine mixte, inflammatoire, immunologique et infectieuse. Les articulations les plus touchées sont les genoux.

L'évolution de ces arthrites mixtes est mal connue, des traitements antibiotiques prolongés seraient indiqués (2, 34, 65, 97).

8. TRAITEMENT

8.1. Prophylaxie

L'éradication de tous les réservoirs de *Borrelia burgdorferi* étant illusoire, les mesures prophylactiques consistent à empêcher le contact avec les vecteurs par le port de vêtements enveloppants, ou, l'entretien de zones limitées comme les parcs, les jardins, les terrains militaires.

En pratique, ces mesures difficilement applicables n'ont qu'une efficacité limitée.

Par contre, il est utile pour les personnes habitant en zone d'endemie d'apprendre :

- à reconnaître les tiques aux 3 stades de leur développement,
- à ôter entièrement la tique de la peau le plus vite possible (au moyen d'une compresse imbibée d'essence de pétrole ou d'éther).
- à consulter son médecin devant toutes lésions cutanées extensives survenues après piqures de tiques.

De même, il serait utile de soumettre les sujets à risques répétés (les professionnels de la forêt) à une sérologie de surveillance effectuée lors d'une visite de santé dans le cadre de la médecine du travail au début de l'hiver afin de diagnostiquer et traiter s'il y a lieu une infection contractée pendant l'été (31). En effet, un traitement antibiotique est d'autant plus efficace qu'il est entrepris tôt.

Cependant, le recours systématique à un traitement antibiotique après morsure de tique ne semble pas justifié vue la faible fréquence de la maladie.

Sauf dans les cas suivants :

- la femme enceinte, en raison du risque possible d'infection foetale décrit par certains auteurs (34, 65),

- les membres d'une même famille mordus par les tiques si l'un des membres présente des symptômes précoces (34, 65, 84).

En conclusion, une bonne prophylaxie à l'heure actuelle reposerait sur 3 points importants :

- une bonne connaissance du milieu,
- une meilleure définition des zones d'endémie
- l'information non seulement des sujets à risques mais aussi du grand public comme c'est le cas depuis plusieurs années aux USA (31).

8.2. Traitement curatif

La présence de *B burgdorferi* ayant été démontrée à tous les stades de la MdL, le traitement repose sur une antibiothérapie adaptée dont la finalité est double :

- guérir les symptômes présents au moment où le malade est vu (soulager le patient),
- prévenir les complications tardives en éradiquant les germes présents, notamment au niveau des articulations et surtout au niveau du système nerveux.

Actuellement, le traitement idéal de la maladie à ses différents stades n'est pas parfaitement établi (97).

Pour atteindre ces objectifs, il faut des antibiotiques auxquels le germe est sensible et, dans les cas neuroméningés, qui permettent l'obtention de concentration intrathécale supérieure à la CMI ou mieux à la CMB vis à vis de *B burgdorferi*.

Tableau 1 : L'AMOXICILLINE

Dénomination commune	Nom de spécialité	Posologie
Amoxicilline	Clamoxyl Hiconcil Bristamox A-Gram Amodex Amoxine Gramidil Zamocilline	2 g/24 h pendant 10 jours, passer à 4 g/24 h pendant 15 jours en cas de formes tardives ou en présence de signes cliniques de dissémi- nation
Amoxicilline + ac. clavulanique	Augmentin	

Tableau 2 : LES CYCLINES

Dénomination commune	Nom de spécialité	Posologie
Doxycycline	Monocline Vibramycine Doxycline Doxygram Doxy-100 Granudoxy Spanor Tolexine	250 à 500 mg x 4/24 h pendant 10 à 15 jours
Autres cyclines Tétracycline	Abiosan Hexacycline Tétracycline Tétramig	250 à 500 mg x 4/24 h

Tableau 3 : CEPHALOSPORINES DE 3° GENERATION

Dénomination commune	Nom de spécialité	Posologie
Ceftazidime	Fortum	3g/24 h en 3 fois IM ou IV
Céfotaxime	Claforan	3g/24 h en 3 fois IM ou IV
Ceftriaxone	Rocéphine	2g/24 h en 1 fois IM ou IV lente
Céfopérazone	Céfobis	4g/24 h en 2 fois IM ou IV lente
Céfotéran	Apacef	2g/24 h en 2 fois IM ou IV lente
Latamoxef	Moxalactam	2g/24 h en 2 fois IM ou IV lente
Ceftizoxime	Cefizox	3g/24 h en 3 fois IM ou IV
Cefixime	Oroken	400 mg/24 h en 2 fois per os.
Cefmenoxime	Cemix	2 à 4g/24h en 2 à 3 fois, IM ou IV

Figure 12 (84)

Une récente étude de Johnson et Mursic (52, 66), malgré les difficultés rencontrées dans l'étude in-vitro de la sensibilité des antibiotiques :

- tests in vitro ne prédisant pas toujours l'activité in vivo (34).
- modèles animaux imparfaits

a permis d'affirmer l'efficacité de certaines β lactamines, cyclines et céfalosporines de 3ème génération (figure 12) (84).

Nous proposons donc le schéma thérapeutique suivant (32) (34).

8.2.1. Phase primaire

L'amoxicilline en fonction de son activité vis à vis de *B burgdorferi*, de sa biodisponibilité, de son passage méningé et de son mode d'administration (per os) paraît être actuellement le traitement le plus logique (32, 34, 84).

Si le malade consulte tôt après l'apparition de l'ECM et qu'aucun signe de dissémination septicémique n'apparaît, la posologie peut être de 2 à 3 g / 24h pendant 10 à 15 Jours.

Chez les patients allergiques aux β lactamines, on utilisera les cyclines et notamment la doxycycline à des doses de 250 à 500 mg en 3 à 4 prises par jour pendant 10 à 15 jours (6, 84).

8.2.2. Phase secondaire

Si le malade n'est pas hospitalisé, on peut utiliser soit l'amoxicilline à forte dose, 4 à 6 g par jour pendant 20 jours, soit la doxycycline à la dose de 300 mg par jour pendant 20 jours.

Si le malade est hospitalisé, on utilise le ceftriaxone (Rocephine^R, médicament hospitalier) en raison de son activité vis à vis de *B burgdorferi*, de sa demi vie prolongée (1 prise par jour) et de son excellent passage méningé (figure 12) (84). Les doses de 2 à 4 g par jour en IM ou IV pendant 14 jours sont utilisées. A défaut, ou en cas d'allergie au β lactamine, les cyclines sont une alternative acceptable. Dans ce cas la doxycycline reste le meilleur choix (34).

8.2.3. Phase tertiaire

Le traitement est semblable à celui de la phase secondaire avec une durée de traitement pouvant atteindre 30 jours dans les formes neurologiques ou articulaires graves.

Cependant, il se pose le problème des arthrites chroniques qui même après un traitement antibiotique bien conduit peuvent persister.

Dans ces conditions, le recours à un traitement chirurgical n'est pas à exclure.

La synoviorthèse ou la synoviectomie ont été proposés (34).

8.2.4. Place des corticoïdes dans le traitement de la MdL

Il n'y a pas d'indication de principe des corticoïdes dans la MdL.

Cependant, chez les patients présentant un trouble auriculoventriculaire grave, en l'absence de réponse au traitement à la 24^{ième} heure, chez les patients atteints de paralysie faciale récente et chez ceux ayant une atteinte neurologique centrale probablement due en partie à des phénomènes inflammatoires vasculaires, on peut sous couvert d'une antibiothérapie efficace utiliser les corticoïdes pour accélérer la régression des troubles (32, 84).

Les traitements mal débutés peuvent être responsables de réactions diverses dont la plus importante est la réaction de Jarish - Herxheimer.

Elle se manifeste dans les 12 à 24 heures qui suivent le début du traitement, notamment, quand celui-ci fait appel à des produits actifs comme l'amoxicilline et la ceftriaxone.

Cette réaction se traduit par de la fièvre, des douleurs articulaires, des myalgies, des céphalées ou une rougeur accrue de l'ECM qui peut alors devenir prurigineux.

Cette réaction peut également être responsable d'une aggravation des manifestations neurologiques.

Il est donc nécessaire de commencer le traitement par de faibles doses, 0,5 à 1 g/24h d'amoxicilline ou 0,5 g/24 h de ceftriaxone, le premier jour pour atteindre la dose efficace au bout de 3 à 4 jours.

Si malgré ces précautions, une réaction de Jarish Herxheimer survient, alors elle pourra facilement être contrôlée par un traitement à base d'aspirine ou par une courte corticothérapie (34, 65).

DEUXIEME PARTIE

DEUXIEME PARTIE**DIAGNOSTIC**

1. GENERALITES	71
2. DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE	72
2.1. Diagnostic non spécifique	72
2.1.1. Dans le compartiment plasmatique	72
2.1.2. Dans le LCR	73
2.1.3. Dans le liquide articulaire	73
2.1.4. Notion de terrain	73
2.2. Diagnostic spécifique	74
2.2.1. Diagnostic direct	74
2.2.2. Diagnostic indirect	75
2.2.2.1. Cinétique des Anticorps	75
a. dans le sang	75
b. dans le LCR	75
2.2.2.2. IFI	76
a. principe	76
b. interprétation	77
c. problème de standardisation	77
d. problème de sensibilité	78
e. problème de spécificité	79

2.2.2.3. <i>Western Blot</i>	81
a. principe	81
b. application	81
c. interprétation	83
2.2.2.4. <i>ELISA</i>	84
a. principe	84
b. choix de l'antigène	85
b.1. tests de 1er génération	87
b.2. tests de 2ème génération	88
b.2.1. méthode utilisant la protéine de 41 Kda purifiée comme Ag	88
b.2.2. méthode utilisant une préparation antigénique enrichie en protéine de 41 Kda	90
b.2.3. méthode utilisant une préparation antigénique déplétée partiellement en protéine de 41 Kda	91
2.2.2.5 <i>Hémagglutination passive ou hémagglutination conditionnée (5, 65, 96)</i>	92
2.2.2.6. <i>Immunocapture (17, 25, 96)</i>	92

3. CONCLUSION	94
----------------------	----

DIAGNOSTIC

1. GENERALITES

Rappel des éléments évocateurs d'une MdL :

- Le début des troubles survient généralement en période estivo-automnale
- Un antécédent de morsure de tique ou d'ECM peut être retrouvé.
- Des polyarthralgies, un syndrome cardiaque avec troubles de la conduction et des manifestations neuromeningées peuvent être observés.
- Ces manifestations peuvent régresser sous antibiothérapie alors que les anti-inflammatoires non stéroïdiens n'ont aucun effet.

Cependant, la notion de piqûre de tique manque souvent et l'expression clinique de la maladie est fréquemment insuffisante pour affirmer le diagnostic (5, 46, 72, 79, 84).

Dans ces conditions, le diagnostic de la MdL doit faire appel au laboratoire. Il se pose alors de nombreux problèmes car parmi les méthodes proposées aucune n'est entièrement satisfaisante.

Nous nous proposons, dans ce chapitre, d'étudier parmi les principales méthodes leurs avantages, leurs inconvénients et, d'envisager qu'elles peuvent être les perspectives d'avenir dans le domaine du diagnostic biologique.

2. LE DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE DE LA MDL

Le diagnostic se décompose en différentes phases.

2.1. Diagnostic non spécifique

Il correspond aux signes biologiques non spécifiques, marqueurs des réactions inflammatoires et immunitaires observées lors de la MdL.

2.1.1. *Dans le compartiment plasmatique (6, 9, 79). Ces réactions sont caractérisées par :*

- une vitesse de sédimentation élevée,
- une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles,
- une hypergammaglobulinémie,
- une atteinte hépatique cytolitique discrète,
- la présence de cryoglobulines de type IgM surtout lors des arthrites,
- des complexes immuns circulants,
- une diminution des fractions C₃ - C₄ du complément.

Lors de l'apparition de l'ECM, quelques uns de ces signes biologiques semblent avoir une valeur pronostique vis-à-vis des complications neuroméningées, articulaires ou cardiaques.

Il s'agit de la présence :

- de cryoglobulines sériques de types IgM,
- d'immunocomplexes circulants et persistants,
- d'un taux d'IgM élevé.

2.1.2. Dans le LCR (9)

En cas de manifestations neuroméningées, on observe :

- une pléiocytose modérée avec une majorité de lymphocytes,
- une protéinorachie légèrement élevée et inconstante,
- une glycorachie normale.

2.1.3. Dans le liquide articulaire (6, 9, 79)

On observe :

- une pléiocytose avec une majorité de polynucléaires neutrophiles,
- des cryoglobulines,
- des fractions du complément.

2.1.4. Notion de terrain

Il faut noter la fréquence de l'allo-antigène HLA DR W2 chez les malades présentant des complications tardives extracutanées (79).

2.2. Diagnostic spécifique

On distingue les diagnostics directs et indirects.

2.2.1. Diagnostic direct

Il consiste à isoler *B burgdorferi* à partir des prélèvements : (79)

- de sang,
- de LCR,
- de biopsie cutanée,
- de liquide synovial.

Or, l'isolement de *B burgdorferi* est délicat et contraignant.

L'observation directe au microscope à fond noir du germe est rarement significative, à cause de sa grande fragilité et de sa faible densité dans les liquides et tissus (25).

Pour compenser la faible densité et les problèmes de conservation du germe, il est nécessaire de pratiquer un ensemencement immédiat sur milieu de culture. Seul quelques laboratoires en sont capables, car les milieux complexes utilisés de type BSK₂ sont difficiles à fabriquer.

La rentabilité de cette culture bien que meilleure dans le LCR que dans le sang est mauvaise. C'est pourquoi, le clinicien se tourne vers la sérologie pour confirmer le diagnostic.

2.2.2. Diagnostic indirect ou méthodes sérologiques

Les méthodes utilisées actuellement consistent à explorer la réponse immunitaire, essentiellement humorale par recherche des Ac dans le serum, le LCR ou éventuellement dans le liquide articulaire (5).

L'immunofluorescence indirecte (IFI), le Western Blot (WB) et l'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), sont les méthodes les plus utilisées que nous détaillerons.

2.2.2.1. Cinétique des anticorps

a) Dans le sang (5, 65, 79)

Les IgM apparaissent 4 à 6 jours environ après l'ECM, pour atteindre un taux maximum entre la 3^{eme} et la 6^{eme} semaine. Ce taux va diminuer dans les semaines suivantes ou persister pendant des mois voire des années en cas de complication.

Les IgG ont un taux initialement bas qui devient maximal plusieurs semaines après l'ECM. Le taux d'IgG peut rester positif pendant des mois voire des années après la maladie.

Les sujets négatifs au début du traitement le restent souvent postérieurement.

b) Dans le LCR

La présence d'Ac dans le LCR est intéressante pour assurer le diagnostic des formes neuroméningées.

Cependant, il faudra toujours distinguer les Ac résultant d'une synthèse locale (intrathécale) et ceux résultant d'un passage à travers la barrière hémato-méningée lésée (79).

2.2.2.2. IFI (*Immunofluorescence indirecte*)

a) Principe

Les différentes étapes de cette méthode sont les suivantes : (35, 70, 96)

- Mettre en présence une suspension antigénique de *B burgdorferi* (préalablement concentrée et fixée sur une lame) et le sérum d'un patient.
- Il y a alors formation d'immuns complexes qui restent fixés sur la lame, si le sérum contient des Ac contre *B burgdorferi*.
- On élimine ensuite par lavage l'excès d'Ac non spécifiques non fixé.
- La révélation se fait par l'addition d'antiglobulines marquées par un fluorochrome (l'isothiocyanate de fluoresceine donnant une coloration verte est le plus fréquemment utilisé).

La lecture se fait au microscope à fluorescence et ne doit prendre en considération que les réactions positives 2⁺ ou 3⁺.

La fluorescence (96) est notée comme suit :

- | | |
|--|----------------|
| - coloration jaune vert éclatant avec périphérie brillante | 4 ⁺ |
| - coloration jaune vert brillant avec périphérie brillante | 3 ⁺ |
| - coloration nette, mais terne | 2 ⁺ |
| - coloration pauvre, mais visible | 1 ⁺ |
| - absence de coloration | 0 ⁺ |

b) Interprétation

L'interprétation des résultats est différente d'un laboratoire à l'autre et en fonction des techniques utilisées.

Si le résultat est positif, on effectue une série de dilutions pour déterminer le titre exact des Ac présents dans le liquide biologique testé, et le titre est l'inverse de la dernière dilution positive.

Pour l'institut Pasteur et de façon de plus en plus générale, un titre de 256 en IgG est la limite acceptable pour affirmer la maladie. Tout en considérant comme Steere ou Eldinger que des titres inférieurs peuvent alerter le clinicien (5).

L'IFI est une méthode peu coûteuse, très souple d'utilisation et simple dans sa technique. Elle peut facilement être adaptée à des séries courtes et répétées.

Malgré ses qualités, cette méthode pose un certain nombre de problèmes, elle semble limitée sur le plan de la standardisation, de la sensibilité et de la spécificité.

c) Problème de standardisation (61)

Schwartz et ses collaborateurs (82) décrivent les variations que l'on peut observer d'un laboratoire à l'autre.

- variations techniques, elles concernent :

--> les antigènes qui ne sont pas préparés de la même façon par les différents laboratoires (milieu, temps de culture et température d'incubation sont différents d'un laboratoire à l'autre).

--> la densité de l'Ag déposé.

--> la qualité des conjugués de fluorescence.

--> le seuil de lecture, l'appréciation de l'intensité lumineuse est subjective en fonction de l'observateur.

- variations dues à l'hétérogénéité des souches existantes (Européenne, Américaine) et à la variabilité antigénique observée in vitro entraînant une variation dans la réponse Ac (6, 65).

Aux U.S.A., une enquête récente a montré que le coefficient de reproductibilité (dans la réponse positif-négatif) était inférieur à 0,3 d'un laboratoire à l'autre (61, 72).

d) Problème de sensibilité (5, 30, 34)

A ce niveau, il est indispensable d'évaluer séparément les différentes phases de la maladie.

Au début de la maladie, la sensibilité de la sérologie est mauvaise puisqu'elle ne dépasse pas 50 % (34, 46, 79).

La sérologie est négative quand : (34, 79)

- L'infection est limitée au niveau cutané et qu'il n'y a pas eu dissémination septicémique.
- On effectue un traitement antibiotique précoce qui empêche la séroconversion (comme dans la syphilis, les sujets séro-négatifs lors de l'institution du traitement le restent en général ultérieurement).
- Le taux d'Ac, dans les formes disséminées, n'est pas encore suffisant pour être détecté par la méthode.

Aux stades secondaires et tertiaires, la sensibilité est excellente. Cependant, il arrive que la sérologie soit négative en phase primo-secondaire ou au début de la phase secondaire.

Il convient alors de répéter la recherche des Ac une à trois semaines plus tard. En effet, le titre maximum d'Ac n'est souvent atteint que des semaines, voire des mois après la piqûre.

La sensibilité de la méthode au niveau du LCR est bonne puisqu'elle a presque systématiquement été positive dans les cas de MdL neurologiques (34).

e) Problème de spécificité

Les faux positifs observés (5, 72, 97) sont dus :

- à l'existence d'une parentée antigénique importante responsable de réactions croisées

--> avec les autres spirochètes :

- . Leptospires, à ce niveau les réactions croisées sont encore très discutées.

- . Tréponèmes T pian responsable du Pian

T caracteum responsable du Pinta

T pallidum responsable de la syphilis

Lors du diagnostic de routine, le problème posé par les réactions croisées dues à T pallidum est facilement contourné.

En effet, les malades atteints de syphilis ont souvent des taux d'Ac élevés vis-à-vis de B burgdorferi. La réciproque n'est pas vraie. Pour cette raison, le TPHA et le VDRL doivent être négatifs pour qu'une sérologie de lyme positive soit considérée comme spécifique et interprétable.

. Borrelia B hermsii
 B turcatoe
 B duttoni

--> avec des germes appartenant à des familles de bactéries très éloignées comme les légionnelles ou les rickettsies.

- à des IgM apparues, au cours d'affections auto-immunes, de la mononucléose infectieuse et vraisemblablement de la tuberculose.

En plus des réactions croisées dues à d'autres germes, il a été observé chez des sujets asymptomatiques, la présence d'Ac à des taux significatifs, notamment chez les sujets vivant en zone d'endémie, ou chez les personnes ayant contractés une MdL et présentant une cicatrice sérologique. Il ne s'agit donc pas de faux positifs (25).

Ceci signifie qu'une sérologie ne permet pas de distinguer les sujets simplement porteurs d'Ac et ceux chez lesquels, ces mêmes Ac sont la preuve d'une infection évolutive. D'où, la nécessité de pratiquer des sérologies à intervalles réguliers pour étudier la cinétique des Ac.

Pour améliorer la spécificité, certains auteurs pratiquent l'absorption de sérum sur le Tréponème, de Reiter (T phagedenis), mais, cette pratique engendre la baisse des titres et l'augmentation du nombre de faux négatifs. Cette amélioration de la spécificité se fait donc aux dépens de la sensibilité (5, 6, 62). De plus, cette méthode est très difficile à standardiser.

2.2.2.3. *Western blot*

a) Principe (39, 70)

Cette méthode consiste à séparer les protéines de *B burgdorferi* en fonction de leur poids moléculaire.

Les différentes étapes de la méthode sont les suivantes :

- Préparation de l'échantillon par dénaturation de l'antigène en SDS - MCE (sodium Dodecyl Sulfate - Mercaptoethanol).
- Séparation des protéines de l'extrait brut par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophorèse).
- Transfert ou Blotting qui consiste à faire passer les protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose par électrotransfert.
- Saturation : étape permettant l'élimination des sites de fixation non spécifiques sur le support.
- Révélation : La membrane de nitrocellulose après lavage, est incubée dans une dilution de sérum à tester. Si le sérum possède des Ac, il y aura formation d'immuns complexes avec fixation des Ac spécifiques sur la membrane.

Après lavage, pour éliminer l'excès d'Ac non spécifiques, on fixe sur les complexes immuns une antiglobuline marquée par une enzyme (40).

La révélation, après élimination de l'excès d'antiglobulines marquées, se fait par l'addition du substrat de l'enzyme utilisée.

b) Application

Cette technique a permis :

- A travers une analyse de la composition antigénique d'un germe, une analyse fine de la réponse Ac vis-à-vis de ces antigènes.

. Pendant l'atteinte initiale (28, 50, 54, 65)

Une à trois semaines après le début de la maladie, apparaissent, chez la moitié des sujets, des IgM contre la protéine de 41 Kda. Après 5 à 6 semaines, la plupart des patients possède des IgM contre cette protéine et parfois aussi contre la protéine de 83 Kda. Après 3 semaines ou davantage, apparaissent chez 25 % des sujets des IgG contre la protéine de 41 Kda. Cette réponse limitée, disparaît en quelques mois.

Cependant, Grodzicki et Steere (39) décrivent pendant cette phase précoce la présence d'IgM et d'IgG contre les protéines de 25, 55, 58 et 66 Kda et quelques fois, également, contre les protéines de 31 et 34 Kda.

. Lors de complication secondaire (65)

La réponse IgM aux protéines de 41 Kda persiste parfois pendant des mois ou des années.

Mais, durant cette phase apparaissent surtout des IgG d'abord contre la protéine de 41 Kda puis 1 à 5 mois après l'ECM contre les protéines de 83, 66, 27 et 15 Kda, puis, plusieurs mois ou années après contre les protéines de 75, 60, 34, 31, 29 Kda.

- de montrer qu'il n'existe pas de corrélation entre le type de bande positive et le stade clinique et que l'ordre d'apparition des Ac est variable (28, 65).

Exemple : Craft et Steere (28) montrent qu'il n'existe pas d'association nette entre l'arthrite et la présence d'un type spécifique d'Ac.

- de caractériser des variations antigéniques importantes, notamment au niveau des protéines de 31 et 34 Kda, ce qui permet de différencier les souches américaines et européennes, et aussi de montrer qu'il existe des protéines communes stables, telle que la protéine de 41 Kda qui est spécifique de genre.

c) Interprétation

L'ensemble des observations :

- variation de la réponse immune en fonction des souches et des individus étudiés.
- possibilité de réactions croisées dues à des protéines communes à *B burgdorferi* et à d'autres bactéries comme la protéine de 60 Kda.

a conduit A. Steere (39) à établir des critères de positivité autre que la simple lecture de telle ou telle bande que l'on croyait spécifique.

Il faut pour affirmer le diagnostic, déterminer la présence

- d'au moins 2 bandes en IgM
- ou - d'au moins 4 bandes en IgG
- ou - d'au moins une bande en IgM plus au moins une bande en IgG.

En conclusion, malgré certains avantages très nets (sensibilité et spécificité importante supérieure aux autres tests (39, 54)) ce test utilise une technique beaucoup trop lourde, chère, de reproductibilité délicate et non adaptable aux grandes séries. Ainsi, il est inutilisable en routine.

Cependant, il reste un outil précieux pour :

- Le diagnostic

Il est conseillé de l'utiliser en complément des méthodes ELISA dans les cas atypiques ou les phases tardives difficiles à diagnostiquer.

- La recherche

Un des avantages essentiels de cette méthode est d'avoir permis d'analyser plus finement la réponse Ac.

A partir de cette découverte, l'élaboration de tests Elisa de 2eme génération a pu être envisagée.

2.2.2.4. ELISA

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

a) Principe (96)

Il existe différents tests dont le principe général est le suivant (figure 13) :

- fixer l'antigène sur un support solide constitué par des billes, tubes, bandelettes mais aussi et surtout par des cupules de microplaques.
- mettre en présence ces microplaques supportant l'Ag et le sérum à tester. Si celui-ci contient des Ac, alors il se forme des complexes immuns.

- faire réagir sur les complexes immuns fixés, après élimination des Ac non spécifiques, une antiglobuline marquée par une enzyme.

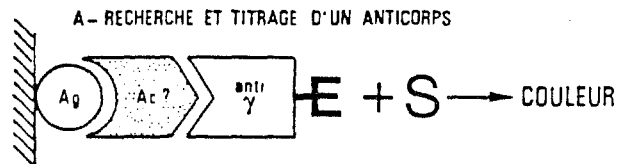
La dernière étape de cette réaction consiste, après élimination de l'excès d'antiglobulines marquées, en sa révélation par addition du substrat correspondant à l'enzyme.

La décomposition enzymatique du substrat laisse apparaître une coloration dont l'intensité appréciée par mesure de la densité optique (DO) (spectrophotométrie) est fonction de la quantité d'enzyme, elle-même fonction de la quantité d'Ac présente dans le sérum (figure 14).

b) Choix de l'antigène

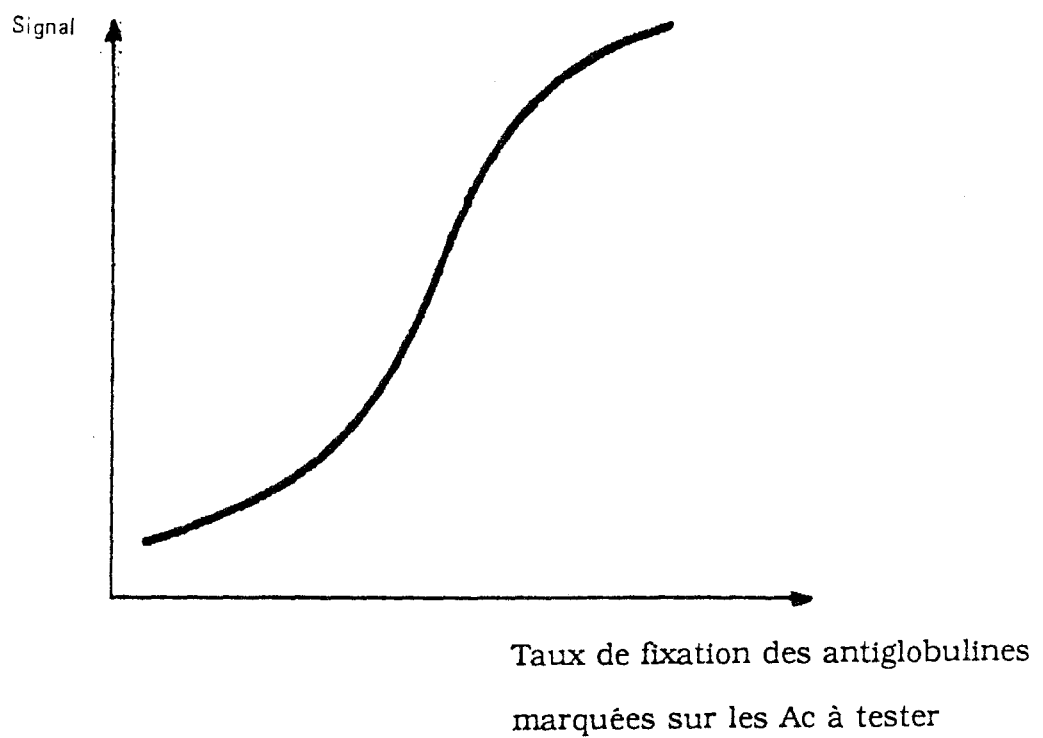
Cette technique enzymatique présente plusieurs avantages (96) :

- Avantages liés à la méthode :
 - . simplification des manipulations par rapport au Western Blot,



Principe de la méthode ELISA

Figure 13 (96)



Le signal augmente en fonction de la quantité d'Ac présent dans le sérum

Figure 14 (96)

- . technique automatisable pour certaines phases du test permettant la réalisation de dépistages ou de titrages en grandes séries,
 - . utilisation d'une seule dilution,
 - . Objectivité des résultats car la lecture de la DO se fait spectrophotométriquement.
- Avantages liés à l'antigène utilisé :
- . meilleure spécificité que l'IFI due à l'utilisation d'Ag plus travaillé.

Cependant, il faut réfréner notre enthousiasme ; car les études effectuées et les résultats obtenus montrent le chemin qu'il reste à parcourir.

Le choix de l'antigène est crucial et conditionne la qualité des résultats.

En fonction de ce choix, deux types de tests ont été décrits :

b.1. Les tests de 1ère génération utilisant un antigène total

Parmi eux on distingue deux méthodes principales :

La première, décrite par Russel et son équipe, utilise un Ag soluble obtenu par sonication de la cellule entière et appelé Ag soniqué (78).

La deuxième, décrite par Magnarelli et son équipe, utilise un Ag figuré constitué par une suspension de spirochètes inactivés par la pénicilline et la streptomycine (63).

Les résultats obtenus par ces méthodes même s'ils constituent une amélioration par rapport à l'IFI, ne semblent pas suffisants en ce qui concerne la sensibilité et la spécificité lors du diagnostic en phase précoce de la maladie.

b.2. Les tests de 2ème génération utilisant des antigènes particuliers, dont l'intérêt a été présenté par l'étude de la réponse Ac aux différentes protéines étudiées en Western Blot.

On distingue les méthodes utilisant comme antigène :

- la protéine de 41 Kda purifiée appelée flagelline,
- l'Ag total enrichi en protéine de 41 Kda,
- l'Ag total déplété partiellement en protéine de 41 Kda.

b.2.1. Méthode utilisant la protéine de 41 Kda purifiée comme Ag : (45)

Cette protéine est la protéine principale constitutive de la flagelle (28, 37).

Hansen et ses collaborateurs (45) dans un souci d'amélioration de la spécificité et de la sensibilité des tests de 1ère génération utilisant comme Ag la cellule entière, décidèrent d'utiliser un Ag immuno dominant unique et le plus spécifique possible de *B. burgdorferi*.

Deux observations firent penser que la flagelline de *B. burgdorferi* pouvait être la protéine la plus adaptée :

- Les études au Western Blot avec *B. burgdorferi* montrèrent une réponse immunologique précoce, forte et constante contre la protéine de 41 Kda.
- Un test ELISA de haute sensibilité a été développé pour le diagnostic de la syphilis utilisant comme Ag le flagelle du tréponème (68).

Hansen (45) dans une étude comparative, montra que le fait d'utiliser comme Ag la protéine de 41 Kda à la place de la cellule entière a amélioré de façon significative la sensibilité et la spécificité en IgM, mais surtout en IgG.

Cette accroissement de performance du test est due à plusieurs facteurs :

- la réponse Ac contre la protéine de 41 Kda a lieu tôt et fortement.
- Les Ag responsables de réactions croisées présents dans les préparations de cellules entières sont éliminés dans cette méthode.

Ces deux facteurs qui améliorent la spécificité et la sensibilité permettent d'abaisser le seuil de positivité lors de la lecture au spectrophotomètre (25, 39, 44).

B. burgdorferi partage des Ag importants non seulement avec les spirochètes mais aussi avec beaucoup d'autres bactéries.

Un seul exemple pourrait être la protéine de 60 Kda appelée Ag commun qui a été identifiée chez plus de 50 bactéries (47).

Ceci explique que l'on trouve fréquemment des réactions non spécifiques à la bande 60 Kda du sérum témoin.

D'autre part, les Ac apparus en réponse à de tel Ag responsables de réactions croisées appartiennent en majorité à la classe des IgG.

Ceci explique, que la spécificité soit principalement améliorée dans les réactions utilisant les IgG, c'est-à-dire en phase tardive, et correspond aux découvertes de Wilske (100) et de ses collaborateurs qui trouvèrent des IgG non spécifiques mais jamais des IgM non spécifiques pour la bande 60 Kda.

Cependant, si l'utilisation d'un seul Ag purifié paraît nette en ce qui concerne l'amélioration de la sensibilité et de la spécificité, il est nécessaire de bien choisir cet antigène.

Des études faites au Western Blot montrent que la protéine de 41 Kda n'est pas complètement spécifique et, qu'elle peut être responsable de réactions croisées

avec des spirochètes oraux, le germe responsable de la fièvre récurrente (*B recurrentis*) ou le *T pallidum* de la syphilis. Mais, ceci n'a que peu d'importance en ce qui concerne la fièvre récurrente et la syphilis.

En effet, les fièvres récurrentes n'apparaissent jamais en Europe ni dans le nord-est des USA, là où la MdL est la plus prévalente. Et la syphilis, se différencie facilement de la MdL cliniquement et sérologiquement par les tests serologiques qui lui sont appropriés (cf. chapitre 2.2.2.2.e).

En conclusion, l'approche présente utilisant un seul Ag et notamment la flagelline semble intéressante.

L'utilisation de la protéine de 41 Kda, en plus d'améliorer la sensibilité et la spécificité des tests, met à l'abri des phénomènes de variation antigéniques car toutes les souches possèdent cette protéine constante (28, 37, 45).

b.2.2. Méthode utilisant l'Ag total enrichi en P41

Malgré tous les avantages reconnus pour l'utilisation de la protéine de 41 Kda purifiée, Le Western Blot a montré que cette protéine n'apparaissait pas toujours la première. D'où, la décision de certains, d'utiliser non plus la flagelline seule mais un Ag total enrichi en protéine de 41 Kda présentant en phase précoce une plus grande diversité d'Ag et un signal toujours aussi fort grâce à l'enrichissement en flagelline (26, 39).

Les résultats obtenus semblent intéressants. Mais, le fait d'utiliser l'Ag total accroît le bruit de fond, cela oblige à augmenter la valeur des seuils significatifs et donc, limite la performance en phase précoce de la maladie.

Grodzicki et Steere imaginèrent alors, afin d'obtenir un test plus sensible et plus spécifique, de préparer un Ag constitué de plusieurs protéines purifiées constantes sur toutes les souches et ne présentant pas de réactions croisées avec d'autres germes.

Cette méthode est apparemment intéressante car elle intègre les avantages des deux méthodes précédentes, c'est-à-dire, réponse forte, nette et précoce avec diversité de stimulation antigénique et bruit de fond peu élevé.

Cependant, en pratique, la principale difficulté rencontrée par ces auteurs a été de déterminer ces protéines spécifiques et précoces en raison de la variabilité antigénique. Actuellement le problème du choix des Ag à utiliser n'a pas été résolu (39, 44, 4, 5).

b.2.3. Méthode utilisant un Ag total dépleté partiellement en P41

L'intérêt de la protéine de 41 Kda dans le sérodiagnostic n'est plus à démontrer, cependant, l'importance de la réponse Ac qu'elle provoque, si elle est intéressante pour améliorer la sensibilité, est quelquefois responsable de réactions croisées.

C'est pourquoi, pour améliorer la spécificité, certains auteurs (36, 20) ont préconisé l'emploi d'un Ag total dépleté partiellement en protéine de 41 Kda, permettant d'obtenir une variété de signaux équilibrés sans que l'un de ces signaux ne prime sur les autres et ne fausse le résultat.

Plusieurs études (20, 36) effectuées sur des patients d'origines diverses montrent que la méthode utilisant cet antigène a une spécificité très proche de celle observée en Western Blot et une bonne sensibilité.

2.2.2.5. Hémagglutination passive ou hémagglutination conditionnée (5, 65, 96)

En s'inspirant des réactions sérologiques utilisées pour la syphilis, une méthode par hémagglutination passive a été proposée.

Mais, il semblerait que cette méthode ne soit pas utilisable à grande échelle et qu'elle manque pour certains auteurs de sensibilité.

De plus, peu de résultats ont été publiés.

2.2.2.6. Immunocapture (17, 25, 96)

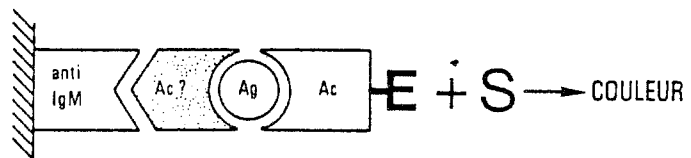
Le principe (figure 15) de cette méthode repose sur la fixation d'Ac anti IgM monoclonaux dans les cupules de microplaques à fond en U permettant la capture d'IgM contenues dans le sérum à analyser.

L'étape suivante consiste à mettre en présence les microplaques supportant les complexes anti IgM - IgM et une préparation antigénique de *B burgdorferi*.

Puis, pour détecter les Ag de *B burgdorferi*, on utilise un immun sérum de lapin où les Ac dirigés contre les Ag de *B burgdorferi* sont marqués par une enzyme.

La révélation se fera par l'addition du substrat de l'enzyme et la lecture par mesure de la DO.

Cette méthode délicate à interpréter semble néanmoins constituer une perspective intéressante dans le diagnostic précoce.



Principe de l'immunocapture

Figure 15 (96)

CONCLUSION

Cliniquement la phase primaire est caractérisée par un ECM alors que les phases secondaire et tertiaire le sont par des atteintes du système nerveux central, périphériques cardiaques et arthritiques.

Or ce tableau clinique est loin d'être toujours retrouvé. La lésion cutanée caractéristique qu'est l'ECM manque souvent et, il existe une possibilité de trouble à long terme pouvant prêter à confusion avec d'autres maladies.

La communauté médicale s'est donc tournée vers le laboratoire pour suppléer le clinicien dans la recherche du diagnostic.

Or comme c'est quelquefois le cas, avec d'autres tests, les tests sérologiques de MdL ne sont pas entièrement satisfaisants et ce, pour des raisons techniques et économiques.

Sur le plan technique, quelque soit le méthode, la sensibilité n'est pas excellente dans les premières semaines de la maladie. Quant à la spécificité, elle est fonction de la méthode utilisée.

Sur le plan économique, la médiatisation ainsi que la nécessité de trouver une méthode efficace ont fait se développer de façon explosive un grand nombre de kits sans qu'il ait été possible comme c'est la règle, d'établir des normes permettant des comparaisons de résultats d'un laboratoire à l'autre, d'une méthode à l'autre.

Cependant, malgré le manque évident de standardisation, d'évaluation et de qualité de certains kits, à l'heure actuelle, on peut résumer l'intérêt de la sérologie de la façon suivant :

- les résultats obtenus en IFI ne peuvent servir que de séroorientation.
- ceux obtenus en Western blot posent ou infirment le diagnostic dans la plupart des cas même s'il reste quelques cas litigieux. Cependant, cette technique est lourde et chère.
- les résultats des tests ELISA de 2ème génération, encore en cours d'évaluation, apportent une amélioration. Nous allons en donner une illustration dans la 3ème partie.

TROISIEME PARTIE

TROISIEME PARTIE

Intérêt de l'ELISA (Platelia^R Lyme) dans le diagnostic de la MdL au stade primaire au CHRU de Grenoble

1.	RESULTATS ACTUELS DE LA SEROLOGIE A L'HOPITAL DE GRENOBLE	99
1.1.	Introduction	99
1.2.	Matériel et Méthodes	100
1.2.1.	Méthodes utilisées	100
<i>1.2.1.1.</i>	<i>IFI</i>	100
<i>1.2.1.2.</i>	<i>Western Blot</i>	100
<i>1.2.1.3.</i>	<i>ELISA (Platelia^R Lyme)</i>	101
1.2.2.	Sérums testés	102
1.3.	Résultats	102
1.3.1.	Résultats obtenus en IFI et WB	102
1.3.2.	Résultats obtenus en ELISA platelia^R	103
<i>1.3.2.1.</i>	<i>Parmi les 71 sérums</i>	103
<i>1.3.2.2.</i>	<i>Parmi les 8 LCR</i>	104
1.4.	Interprétation discussion	105
1.4.1.	Spécificité	105
<i>1.4.1.1.</i>	<i>Spécificité de l'IFI</i>	105
<i>1.4.1.2.</i>	<i>Spécificité de l'ELISA</i>	105
1.4.2.	Sensibilité	106
<i>1.4.2.1.</i>	<i>Sensibilité de l'IFI</i>	106
<i>1.4.2.2.</i>	<i>Sensibilité de l'ELISA</i>	106

2.	ETUDE DE 5 PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE DE LYME	
	EN PHASE PRIMAIRE	108
2.1.	Présentation	108
2.2.	Discussion	115
	2.2.1. Du point de vue épidémiologique	115
	2.2.2. Du point de vue clinique	116
	2.2.3. Du point de vue biologique	117

**Intérêt de l'ELISA (Platelia^R Lyme)
dans le diagnostic de la MdL au stade cutané au CHRU de Grenoble**

**1. RESULTAT ACTUEL DE LA SEROLOGIE A L'HOPITAL DE
GRENOBLE**

1.1. Introduction

Au CHRG, la sérologie est pratiquée depuis octobre 1987.

L'IFI est utilisée de façon systématique comme méthode de routine.

Le WB est utilisé depuis 1989 en confirmation des sérums ayant un titre supérieur à 160 en IFI ainsi que dans les cas négatifs en IFI où la clinique est très évocatrice.

L'ELISA (Platelia^R Lyme) est utilisée depuis avril 1990 dans les mêmes conditions que le WB.

Dans notre étude, dans un souci d'évaluation du test, en plus des utilisations décrites ci-dessus, l'IFI et l'ELISA ont été appliquées à des sérums de donneurs choisis au hasard.



1.2. Matériel et méthodes

1.2.1. Méthodes

1.2.1.1. IFI

Dans l'immunofluorescence indirecte, on utilise comme Ag, des *Borrelia* de la souche B31.

Au début des tests, on a utilisé des lames préparées de façon artisanale, puis par la suite, celles du groupe Bio-Mérieux (Les Lyme spot IF Bio-Mérieux souche B31) .

1.2.1.2. Western Blot

L'Ag est préparé au Laboratoire :

- la dénaturation de l'Ag a lieu en SDS-MCE,
- la séparation des protéines de l'extrait brut s'effectue par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% (SDS-PAGE).
- le transfert des protéines du gel sur la membrane de nitrocellulose se fait par transfert semi sec.

La réaction elle-même, en présence du sérum à tester, s'établit dans les conditions suivantes :

- on incube des dilutions de sérums (1/200 pour les IgG et 1/20 pour les IgM) une nuit à 4°C,
- on ajoute une antiglobuline humaine marquée à la peroxydase,
- la révélation finale est due à la diaminobenzidine.

En ce qui concerne la lecture, on applique les critères d'interprétation de Steere,

un WB sera considéré comme positif s'il présente :

- au moins 4 bandes en IgG,
- ou - au moins 2 bandes en IgM,
- ou - au moins 1 bande en IgG plus au moins 1 bande en IgM.

1.2.1.3. ELISA (*Platelia^R Lyme*)

Le test *Platelia^R Lyme* met en jeu une technique immuno-enzymatique indirecte en phase solide pour détecter les Ac sériques anti *B burgdorferi*.

- La phase solide constituée de barrettes de puits est sensibilisée à l'aide d'Ag *B burgdorferi* dépletés partiellement en protéine de 41 Kda,
- le sérum humain à tester est incubé dans un des puits, il y a alors liaison de l'Ac anti *B burgdorferi* à la phase solide,
- des Ac anti-immunoglobulines humaines (spécifiques des IgG et des IgM) marqués à la peroxydase de raifort sont alors ajoutés,
- la révélation se fait par ajout du substrat de l'enzyme (le peroxyde d'urée) et du chromogène (le tétraméthylbenzidine),
- la lecture se fait spectrophotométriquement. L'intensité de la couleur obtenue est proportionnelle à la quantité d'Ac liés dans le puits.

1.2.2. Sérums testés

Ce sont des sérums de patients venus consulter ou hospitalisés au CHRG dans différents services (en particulier les services de neurologie, rhumatologie, dermatologie, maladies infectieuses), ayant fait l'objet d'une sérologie de Lyme dans le cadre d'un bilan général rendu nécessaire par le tableau clinique que présentaient ces patients.

En IFI 1400 sérums recencés depuis octobre 1987 ont été testés . Parmi ces 1400 sérums, deux sont ceux de syphilitiques.

En ELISA, on a effectué 79 sérologies dont 71 sur sérums et 8 sur LCR.

Parmi les 71 sérums étudiés :

- 23 viennent des 1400 précédents. Parmi eux, 13 sont ceux de malades de Lyme et 10 sont des faux positifs de l'IFI,
- 48 viennent de donneurs de sang choisis au hasard.

Parmi les 8 LCR étudiés :

- 2 viennent de malades de Lyme (choisis parmi les 13 étudiés précédemment),
- 6 viennent de la sérothèque de l'hôpital, et regroupent des maladies neurologiques variables dont une syphilis.

1.3. Résultats

1.3.1. Résultats obtenus en IFI et WB

Les résultats sont donnés par le tableau suivant en IFI :

Titre	0	80	160	320	>320
Nb de patient					
1400	1147	140	61 (dont 1 syphilitique)	42	10 (dont 1 syphilitique)
100%	82%	10%	4,3%	3%	0,7%

Tableau 1

En fixant à 160 le seuil de positivité, on dénombre 113 cas de patients possédant un taux significatif d'Ac.

Le WB appliqué comme il a été décrit dans l'introduction a permis d'établir que seulement 13 sérums sur les 1400 étudiés appartenaient à des malades de Lyme. Parmi ces 13 malades 11 étaient positifs et 2 étaient négatifs en IFI.

1.3.2. Résultats obtenus en ELISA

71 sérums et 8 LCR ont été étudiés (Tableau 3 et 4).

1.3.2.1. Parmi les 71 sérums

On observe que :

- les 13 sérums de maladies de Lyme se sont révélés positifs en ELISA,
- les 48 sérums de donneurs choisis au hasard sont négatifs en ELISA.
- les 10 sérums de patients non atteints par la maladie de Lyme, IFI positifs mais WB négatifs, se sont révélés négatifs en ELISA.

Titre en IFI des faux positifs étudiés

Titre Nb de sérums	160	320	>320
10	5 (dont 1 syphilitique)	4	1 (dont 1 syphilitique)

Tableau 2

1.3.2.2. Parmi les 8 LCR

On observe que :

- Les 2 LCR de patients atteints d'un Lyme neurologique chez qui le WB est positif ont donné chacun une réponse positive en ELISA,
- Les 6 LCR de patients atteints d'autres maladies que la MdL ont donné des résultats négatifs en ELISA.

Nb total de sérums étudiés	sérums de malade de Lyme		sérums de donneurs de sang		sérums des faux positifs de l'IFI	
	>0	<0	>0	<0	>0	<0
71	13		48		10	
WB	13	0	non effectué		0	10
ELISA	13	0	0	48	0	10

Tableau 3

Nb total de LCR	LCR de malade de lyme		LCR de malades issues de la sérothèque	
	>0	<0	>0	<0
8	2		6	
WB	2	0	0	6
ELISA	2	0	0	6

Tableau 4

1.4. Interprétation discussion

1.4.1. Spécificité

1.4.1.1. Spécificité de l'IFI

Dans notre étude, les résultats obtenus nous obligent à conclure sur le manque de spécificité de cette méthode.

En effet, parmi les 1400 sérums observés, 102 sont des faux positifs. 2 de ces faux positifs sont dus à des réactions croisées engendrées par des Ac dirigés contre le germe de la syphilis.

1.4.1.2. Spécificité de l'ELISA

Dans notre étude, parmi les 79 sérologies effectuées, seules celles de patients atteints de MdL ont été déterminées positives en ELISA.

De plus, en ce qui concerne les réactions croisées, les 2 sérums de syphilitiques ainsi que les 6 LCR de la sérothèque dont 1 de syphilitique ont été trouvés négatifs en ELISA.

Il semblerait donc aux vues de cette étude que les résultats obtenus par cette méthode ne soient pas perturbés par des faux positifs.

Mais, pour obtenir des résultats réellement concluants, il aurait fallu étudier une population plus importante de sérums ou de LCR de patients atteints :

- de maladie dont les germes responsables, sont capables de faire sécréter des Ac communs à ceux engendrés par *B burgdorferi* lors de la MdL,

- d'affections auto-immunes, de mononucléoses ou de personnes vivant en zone d'endémie.

1.4.2. Sensibilité

1.4.2.1. Sensibilité de l'IFI

La sensibilité de la méthode s'est révélée insuffisante dans cette étude. En effet, 2 des 13 sérums de maladie de Lyme avaient des taux d'Ac inférieur à 160. Il s'agissait de cas cutanés.

1.4.2.2. Sensibilité de l'ELISA

Dans l'étude de la sensibilité, il faut tenir compte de la cinétique des Ac et distinguer phase précoce et phases tardives. En principe, le taux d'Ac est suffisant pour être détecté lors des phases tardives par contre, il est souvent insuffisant au début de la phase primaire et se pose alors le problème des faux négatifs.

Il faudrait également pour tester la sensibilité en phase primaire, disposer d'une population d'au moins une centaine de personnes en phase d'ECM après morsures de tiques. Malheureusement, nous ne disposons pas de ce type de population.

Cependant dans cette étude toutes les maladies de Lyme ont été trouvées positives en ELISA, y compris les deux faux négatifs de l'IFI. Il semblerait donc que cette méthode malgré le faible nombre de sérums étudiés soit plus sensible que l'IFI.

En conclusion

Dans notre étude nous n'avons pas observé de faux positifs ni de faux négatifs bien qu'aucun cas de MdL négatif en WB et ELISA n'ait été étudié.

Ceci nous a permis de conclure, malgré le faible nombre de cas, que le test ELISA Platelia^R, utilisant un Ag total dépleté partiellement en protéine de 41 Kda, est un test intéressant qui semble sensible et spécifique.

2. ETUDE DE 5 PATIENTS ATTEINTS DE MdL EN PHASE PRIMAIRE

2.1. Présentation

Cas n° 1

Madame Simone C., 42 ans, domiciliée à Grenoble.

Le 31/08/1989 Madame C. consulte à Chambéry. Elle présente un placard érythémateux au niveau de la jambe gauche, une arthralgie du genou gauche, une augmentation de volume des ganglions inguinaux et une fièvre à 38° constante depuis quelques jours.

Elle se souvient avoir été piquée par une tique le 15 août lors d'une journée à la campagne en Ariège.

Docteur L. suspectant une MdL propose le traitement suivant :

- Clamoxyl 2g/J/15J,
- pansement anti-inflamatoire.

et demande deux sérologies de contrôle à 15 jours d'intervalle.

Les résultats de la première sérologie faite à Grenoble le 14/09/1989 donne les résultats suivants :

- IFI > 0 avec un titre à 160
- WB < 0 en IgG
- WB > 0 en IgM, 2 bandes dont celle de la 41 Kda sont observées
- ELISA > 0 avec une DO à 0,583 pour un seuil fixé à 0,23.

Le 3/10/1989 à l'occasion d'une visite de contrôle, un médecin du CHRG observe que tous les signes décrits précédemment ont disparu excepté une dysesthésie au niveau de la jambe gauche.

La deuxième sérologie effectuée ce même jour donne les résultats suivants :

- IFI > 0 avec un titre à 160
- WB < 0 en IgG
- WB > 0 en IgM, 2 bandes sont observées

Le 14/11/1989, Madame C. consulte à nouveau pour une angine, asthénie et une douleur à l'épaule droite. Une sérologie pratiquée au moment de cette visite, donne les résultats suivants :

- IFI > 0 avec un titre à 160
- WB < 0 en IgG
- WB > 0 en IgM, 2 bandes sont observées mais avec une intensité de la P41 diminuée par rapport à la première sérologie.
- ELISA > 0 avec une DO à 0,278 pour un seuil à 0,23.

Le traitement prescrit est le suivant :

- Coluhextril,
- Lysopaïne.

Le 2/10/1990 la patiente consulte pour une douleur persistante au genou, signe du rabot, mais pas de température. Une sérologie de contrôle donne les résultats suivants :

- IFI < 0 avec un titre à 80,
- WB < 0 en IgG et IgM,
- ELISA < 0

aucun traitement n'est proposé

Cas n° 2

Madame Andrée C., 61 ans, domiciliée à Vif.

Le 14/11/1989, la patiente consulte son médecin traitant pour un placard inflammatoire érythémateux eczématisé de la face antérieure droite de la cuisse faisant suite à un petit erythème que le malade a traité avec de l'Hexomédine. Après interrogatoire, pendant lequel aucun signe autre que ceux décrits précédemment n'a été relevé, le médecin suspectant une allergie à l'Hexomédine propose le traitement suivant :

- Locoïde 2 fois /J/8 J

Le 23/11/1989, la patiente revient alarmée par l'aggravation de sa lésion qui s'est agrandie, surélevée sur les bords avec au centre une tâche brunâtre ressemblant à un reste de piqûre.

A l'interrogatoire, aucune notion de piqûre de tique ou d'autre animal ainsi qu'aucune notion de fièvre ne sont évoquées. Le médecin suspectant une MdL demande une sérologie de contrôle et propose le traitement suivant :

- Clamoxyll 2 g /J/15 J

La première sérologie donne les résultats suivants :

- IFI < 0,
- ELISA < 0

Le 5/12/1989, il existe une nette amélioration de l'état général avec une disparition de l'oedème induré mais persistance de l'érythème.

Le 15/12/1989, une deuxième sérologie est effectuée et donne les résultats suivants :

- IFI < 0,
- WB < 0 en IgG,
- WB > 0 en IgM, mais seule la bande correspondante à la protéine de 41 Kda apparaît,

- ELISA > 0 avec une DO à 0,29 établit pour un seuil fixé à 0,19.

Le 5/01/1990 date de la dernière visite de la patiente.

Une guérison totale est observée.

Cas n° 3

Madame Marie-Jeanne B., 50 ans, domiciliée à Grenoble.

Le 7/09/1990 Docteur J. reçoit Madame B. adressée par un médecin généraliste qui l'a vu deux mois auparavant et l'a traitée pour une réaction allergique à une piqûre d'insecte sur la face antéro interne du genou droit survenu 2 ou 3 jours plus tôt.

Le traitement prescrit pour la réaction allergique est :

- Diprosone pommade,
- Actidilon crème,
- Hismanal.

Docteur J. observe alors une tâche rouge, de 15 cm de diamètre, de taille augmentée par rapport à la lésion initiale, à bordure marginée et non indurée, sans guérison centrale. De plus, une petite fièvre 37,7-38 depuis quelques jours est signalée. Le médecin suspectant une MdL demande deux sérologies de contrôle à 15 jours d'intervalle mais ne propose aucun traitement.

La première sérologie effectuée le 12/09/1990 donne les résultats suivants :

- IFI > 0 avec un titre à 160,
- WB < 0 en IgG et IgM,
- ELISA < 0 avec une DO à 0,13 pour un seuil établi à 0,16 (il s'agit plus exactement d'un cas limite).

Le 28/09/1990, suite à une deuxième consultation, le médecin observe une extension du placard érythémateux atteignant 40 cm de diamètre avec une guérison centrale sans trace de piqure.

Le traitement suivant est proposé :

- Clamoxyl 3g/J/15 J

Une sérologie pratiquée le 15/10/1990 montre une montée des Ac en WB et ELISA, les résultats sont :

- IFI > 0 avec un titre à 160,
- WB > 0 avec une bande en IgG et une bande en IgM,
- ELISA > 0 avec une DO à 0,2 pour un seuil fixé à 0,16.

Le 26/10/1990 soit presque 1 mois après la dernière visite, la disparition de tous les signes cliniques est observée.

Cas n° 4

Jean-François C., domicilié à Grenoble.

Après un voyage dans l'ouest des U.S.A. du 27 juin au 22 juillet, Monsieur C. consulte à Grenoble le 23 juillet chez un dermatologue pour un érythème de 30 cm de diamètre (aspect en cocarde) ayant débuté dès la deuxième semaine de juillet au niveau de l'abdomen par un érythème papuleux qui s'est mis à migrer de façon centrifuge.

Le diagnostic de MdL étant posé, le traitement suivant est proposé : Clamoxyl 1 g/J/15 J que le patient ne suit que 5 jours.

Fin juillet, le patient observe la diminution de l'érythème qui avait atteint lors de sa poussée migratrice le thorax et la mi-cuisse.

Le 26/10/1989 après avoir discuté de ses problèmes avec un ami médecin, il décide de consulter à l'hôpital pour une lésion érythémateuse persistante de 6 cm de diamètre.

Une sérologie est demandée, les résultats sont :

- IFI < 0 avec un titre à 80,
- WB > 0 avec une bande en IgG et 2 en IgM,
- ELISA > 0 avec un titre à 0,27 pour un seuil fixé à 0,19.

Le traitement suivant est proposé Spanor 2g/J/ 21 J.

Le 21/11/1990 le patient revenu pour une sérologie de contrôle ne présente aucun symptôme.

Les résultats de la sérologie sont :

- ELISA < 0 avec un titre à 0,17 pour un seuil fixé à 0,19.

Cas n° 5

Anna B., domiciliée à Thonon.

En Août 1988, elle présente au niveau du mollet un placard infiltré faisant suite à un érythème annulaire centrifuge apparu 4 à 5 mois avant.

Un traitement par Clamoxyl à la dose de 2 g/ J pendant 15 J est proposé.

On observe alors la disparition totale des lésions.

Une première sérologie effectuée en Août 1988 donne les résultats suivants :

- IFI > 0 avec un titre à 640
- WB > 0
- ELISA > 0 avec une DO à 0,632 pour un seuil fixé à 0,17.

En Juin 1989 une deuxième sérologie donne les résultats suivants :

- IFI > 0 avec un titre à 640

- WB > 0

- ELISA > 0 avec une DO à 0,462 pour un seuil fixé à 0,17.

En Mai 1990 cette patiente consulte à nouveau pour un urticaire chronique probablement pas en rapport avec la MdL.

Une sérologie est cependant demandée et donne les résultats suivants :

- IFI > 0 avec un titre à 320

- WB > 0

- ELISA > 0 avec une DO à 0,339 pour un seuil fixé à 0,17

Dates des sérologie	IFI (Titre)	WB	ELISA (DO)	seuil
Simone C.				
14/09/89	160 : >0	2 bandes en IgM:>0	0,583 :>0	0,23
4/10/89	160 : >0	2 bandes en IgM:>0	-----	
14/11/89	160 : >0	2 bandes en IgM:>0	0,278:>0	0,23
2/10/90	----	<0	<0	
Andrée C.				
24/11/89	0 : <0	----	0 : <0	0,19
15/12/89	0 : <0	1 bande en IgM	0,29 : >0	0,19
Marie-J. B.				
12/9/90	160 : >0	<0	0,13 : <0	0,16
15/10/90	160 : >0	1 bande en G >0 1 bande en M	0,20 : >0	0,16
Jean-F. C.				
26/10/89	80 : <0	1 bande en G >0	0,27 : >0	0,19
22/11/90	----	2 bandes en M ----	0,17 : <0	0,19
Anna B.				
Août 88	640 : >0	>0	0,632 : >0	0,17
Juin 89	640 : >0	>0	0,462 : >0	0,17
Mai 90	320 : >0	>0	0,339 : >0	0,17

Tableau récapitulatif des valeurs des différentes sérologies

2.2. Discussion

2.2.1. *Du point de vue épidémiologique*

Parmi les cinq patients étudiés, quatre sont des femmes. Dans la littérature (5, 34, 65) le sex-ratio est habituellement équilibré. Ce n'est pas le cas dans notre étude mais notre série est trop limitée en nombre pour que l'on puisse en tirer des conclusions.

Trois malades seulement sur cinq se rappellent avoir été piqués (deux par une tique et une par un insecte non identifié).

Ceci est une notion bien classique dans la littérature où la notion de piqûre n'est pas toujours retrouvée lors de l'interrogatoire (46, 65, 84).

Tous les sujets ont développé leur maladie entre le début de l'été et la fin de l'automne comme cela est classiquement décrit (31, 34, 42, 65, 75).

Le lieu exact de contamination n'est pas toujours connu et ne correspond pas à chaque fois au lieu de résidence :

- le sujet n° 1 s'est infecté lors d'un séjour en Ariège, le sujet n° 4 aux Etats-Unis (Californie) et le sujet n° 5 très probablement en Haute-Savoie. Il s'agit donc de cas non strictement locaux,
- le sujet n° 2 est domicilié à Vif, mais il n'existe pas de notion de piqûre. On ne peut donc pas être sûr du lieu de contamination,
- le sujet n° 3 réside à Grenoble mais, le malade n'a pas précisé le lieu exact de sa piqûre.

Il est difficile de tirer des conclusions épidémiologiques précises à partir de cinq cas, néanmoins on peut remarquer que trois sur les cinq malades ont été contaminés en dehors de la région Grenobloise.

Nous avons vu précédemment que seuls 13 cas de MdL authentiques ont été recensés depuis octobre 1987 à l'hôpital de Grenoble. Ces observations laissent à penser que la maladie est rare dans la région et que nous ne sommes pas dans une "zone à risque".

2.2.2. Du point de vue clinique

Plusieurs points sont à noter :

- L'aspect des lésions est très variable tout au début de la maladie :

--> chez le patient n° 1, il s'agit d'un placard érythémateux banal sans guérison centrale,

--> chez le patient n° 2, la lésion est au début peu évocatrice. On observe une tâche érythémateuse éczématisée, se complétant par l'apparition d'un liseré périphérique surélevé avec une tâche centrale réalisant un aspect en "cocarde" caractéristique (34),

--> chez le patient n° 3, il s'agit au départ, d'une banale réaction inflammatoire à une piqûre d'insecte. Puis, la lésion va s'agrandir et devenir typique,

--> chez les patients n° 4 et 5 les lésions ont été d'emblée évocatrices.

Enfin, il faut noter que nous n'avons malheureusement pas pu retrouver dans les observations des notions sur les signes fonctionnels d'accompagnement (prurit, brûlure, picotement ...).

En résumé, 3 fois sur 5 les lésions de départ étaient non évocatrices et 2 fois sur 5 le diagnostic n'a pas été posé en première intention.

L'inconstance des signes généraux associés :

Chez le cas n° 1, il existe une fièvre à 38°, des adénopathies et une arthralgie du genou gauche.

Chez le cas n° 3, il existe un fébricule sur plusieurs jours.

Dans les autres cas il n'y a pas eu de signes généraux.

L'efficacité constante du traitement :

Tous les malades ont été traités par Clamoxyl. Dans le cas n° 4, ceci a été complété par un traitement à base de Doxycycline.

Dans tous les cas les lésions ont disparu et ceci apporte une confirmation au diagnostic. On peut émettre une réserve pour le sujet n° 5 chez qui il subsiste deux ans après la maladie un urticaire chronique. La maladie a-t-elle été complètement enrayée ?

2.2.3. Du point de vue biologique

Notre étude a permis diverses observations

- La première constatation est la meilleure sensibilité de l'ELISA par rapport à l'IF.

Cas n° 1 : L'IFI est à une valeur limite (160) ne permettant pas de conclure alors que l'ELISA est franchement significative.

Cas n° 2 : Négativité en IF.
Seroconversion en ELISA.

Cas n° 3 : Valeur limite stable en IFI (160)

Montée des taux d'Ac en ELISA.

- Cas n° 4 : Taux non significatif en IFI
Taux positif en ELISA
- Cas n° 5 : Très nette positivité des deux tests

Dans quatre cas sur cinq, l'ELISA a donc été plus sensible.

- Une question intéressante à étudier est la date d'apparition des Ac par rapport au début des signes (en ELISA). Nous n'avons pas toujours tous les éléments pour y répondre mais nous pouvons faire plusieurs observations.

- Cas n° 1 : Le 1er sérum à J + 30 (J = jour de la piqûre) est positif en ELISA.
- Cas n° 2 : On ne connaît pas la date de la piqûre mais le 1er sérum 10 jours après la consultation est négatif. Le 2ème sérum 1 mois plus tard est positif.
- Cas n° 3 : Le 1er sérum à J + 68 est limite en ELISA.
Le 2ème sérum à J + 100 est positif en ELISA.
- Cas n° 4 : Le 1er sérum à J + 125 est positif en ELISA.
- Cas n° 5 : Le 1er sérum à J + quelques mois est positif en ELISA.

Dans 3 cas (cas n° 1, 4, 5) sur 5 le premier sérum a été d'emblée positif, mais il est souvent tardif et on ne peut pas en conclure la date réelle d'apparition des Ac chez le malade.

Dans les 2 autres cas, on a eu des séroconversions tardives (entre J+68 et J+100, pour le cas n° 3, plus de 10 jours après la consultation pour le cas n° 2). Ces deux séroconversions ont eu lieu après l'instauration du traitement. On peut imaginer que la lyse des germes au niveau cutané, entraîne la libération d'Ag circulants, déclenchant une réponse antigénique.

Ceci peut laisser penser que dans certains cas tant que la maladie reste strictement cutanée, la réponse avant traitement peut être trop faible pour être détectée (5, 65, 79).

- Au point de vue de la cinétique des Ac, nous ne pourrions discuter que sur les cas n° 1, 4, 5.

--> En ELISA :

- . Le cas n° 1, traité précocement (J+15) voit son taux d'Ac diminuer très rapidement sur une période de deux mois. Une sérologie de contrôle effectuée un an après est négative.
- . Le cas n° 4 est traité une première fois 3 semaines après la piqure mais le sujet suit mal son traitement. 3 mois plus tard, il conserve une lésion cutanée et il est à nouveau traité. Du point de vue sérologique, l'ELISA reste à une valeur limite plus d'un an après le deuxième traitement.
- . Le cas n° 5 est traité 4 à 5 mois après la piqure avec disparition totale des lésions. Son taux d'Ac diminue très progressivement sur une période de deux ans, sans se négativer. La question de l'efficacité thérapeutique chez cette malade peut être posée. En effet, cette patiente présente actuellement des lésions d'urticaire chronique.

Il semble probable que la sérologie se négative mieux quand le traitement est précoce comme cela se voit par exemple dans la syphilis (34).

Y-a-t-il toujours négativation des Ac lorsque la maladie est correctement traitée ? Ou dans les cas de traitement tardif, arrive t-on seulement à une diminution des Ac avec persistance d'une cicatrice sérologique ?

Il est difficile de répondre à ces questions étant donné le faible nombre de cas dont nous disposons. De plus, la littérature sur ce sujet ne nous apporte que des informations partielles (5, 34, 46, 79) confirmant l'importance d'un traitement précoce et les difficultés rencontrées dans le traitement de phases très avancées, mais, sans jamais faire le lien avec la sérologie à long terme.

--> En immunofluorescence

L'étude de la cinétique des Ac après traitement est décevante (stabilité ou très faible baisse).

--> Le WB n'est pas une technique adaptée à un suivi sérologique à cause de son mode de lecture (il est difficile d'apprécier objectivement la diminution de l'intensité de la coloration d'une bande).

En conclusion, nous insisterons sur le fait que la clinique ou la sérologie étudiées séparément n'aurait pas permis de poser de façon certaine le diagnostic dans tous les cas.

- La clinique, à cause des lésions en phase très précoce souvent peu caractéristique.

- La sérologie certainement plus à cause du temps de latence des Ac au début de la maladie qu'à cause d'un manque de performance de certains tests.

CONCLUSION

La maladie de Lyme, entité médicale récente (1977) portant le nom d'une petite ville des USA (Lyme dans le Connecticut) regroupe plusieurs signes cliniques, dont certains comme l'ECM ou les manifestations rhumatologiques patognomoniques de la maladie ont été décrits depuis longtemps.

Il s'agit d'une zoonose à *Borrelia burgdorferi* saisonnière, transmise par des vecteurs arthropodes dont les principaux sont les tiques.

La distribution de la maladie est liée à la répartition de ces principaux vecteurs : *Ixode ricinus* en Europe, *Ixode dammini*, *pacificus* et *scapularis* aux USA.

Les symptômes de la maladie évoluent en trois phases, d'abord des manifestations cutanées, puis des manifestations cardiaques et neurologiques et enfin articulaires.

Chaque patient ayant une partie ou plus rarement l'ensemble de ces symptômes.

La pathologie n'est pas encore clairement élucidée bien que plusieurs hypothèses aient été avancées.

Les antibiotiques tant par leurs effets immédiats, que par leur action préventive sont le traitement de choix.

Le diagnostic en raison, des difficultés rencontrées dans l'isolement du germe, de la clinique souvent peu évocatrice, est essentiellement sérologique. A l'heure actuelle, il n'est pas fiable à 100 %.

La bibliographie a montré l'amélioration des techniques biologiques issues d'études en WB et particulièrement l'apport des tests ELISA de 2ème génération dont le Platelia^R Lyme du point de vue de la sensibilité et de la spécificité.

Ceci a été illustré par une étude pratiquée au CHRG où, dans une première partie nous avons déduit l'intérêt du Platelia^R par rapport à l'IFI et au WB : il s'est révélé globalement plus intéressant car à la fois sensible, spécifique et utilisable en routine.

La deuxième partie de l'étude a montré à quel point, il était impossible de poser un diagnostic de certitude en ne tenant compte que de la clinique souvent peu évocatrice, voire inexistante ou que de la sérologie limitée en sensibilité (notre étude n'a pas permis d'évaluer la spécificité).

Il semble donc nécessaire de faire évoluer les méthodes sérologiques en vue d'améliorer le diagnostic. C'est pourquoi, actuellement de nombreuses équipes travaillent sur le sujet et notamment en WB pour trouver quelles sont les protéines contre lesquelles l'organisme développent des Ac spécifiques et précoces.

Dans l'avenir apparaîtront certainement des kits de 2ème génération probablement en ELISA compétition ciblant grâce à des Ac monoclonaux un épitope très précis constant et spécifique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. AFZELIUS. A
Report to "verhandlungen der dermatologischer gesellschaft zu Stockolm"
on december 16, 1909.
Arch. Dermatol. Syph, 1910, 101, 405-404.
2. AMOR. B, ROUX. C
Manifestations rhumatologiques de la maladie de Lyme.
Gazette médicale 1989, 96, 10.
3. ANDERSON. JF, DOBY. JM, COUTARMANACH. A, HYDE. FW, JOHNSON. RC.
Différences antigéniques entre souches de B burgdorferi isolées d'Ixodes
ricinus en Bretagne.
Méd. Maladies infect., 1986, 3, 171-175.
4. ANDERSON. JF, MAGNARELLI. LA, BURGDORFERI. W, BARBOUR. AG.
Spirochètes in I dammini and mammals from Connecticut.
Am. J. trop. Med Hyd, 1983, 32, 818-824.
5. ASSOUS. M
A propos du diagnostic biologique de la borreliose de Lyme.
Med et Mal. infct., 1989, 19, 12, 734-740.
6. BARANTON. G
Maladie de Lyme, une terminologie récente pour un complexe pathologique
oublié.
Ann. Pediatr. (Paris), 1987, 34, 8, 593-598.

7. BARANTON. G
Classification des spirochètes infestant l'homme.
Revue du Prat. (Paris), 1989, 39, 15, 1287-1290.

8. BARANTON. G
Sérologie de la borreliose de Lyme. Appoint diagnostic ou source de confusion ?
JAMA, 28 Fév. 1990, 15, 199.

9. BARATON. G, ELDINGER. C, MAZZONELLI. J, DUFRENE. Y
La borreliose dite de Lyme, maladie nouvelle identifiée depuis près de 80 ans.
Med. et Mal. infect., 1986, 12, 747-755.

10. BARBOUR. AG.
Isolation and cultivation of Lyme disease.
J. Biol. Med. 1984, 71-75.

11. BARBOUR. AG, HEILAND. RA, HOWE. TR
Heterogeneity of major proteins in Lyme disease Borreliae : a molecular analysis of North American and European isolates.
J. infect dis., sept 1985, 152, 3, 478-484.

12. BARBOUR. AG, TESSIER. SL, HAYES. SF
Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochètes.
Infec. Imm. 1984, 45, 1, 94-100.

13. BARBOUR. AG, TESSIER. SL, TODD. WJ
Lyme disease spirochetes and Ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody.
Infect Imm., 1983, 41, 2, 785-804.
14. BEC. G, HABICHT. GS, BENACH. JL, COLEMAN. JL
Chemical and biological characterization of LPS extracted from the Lyme disease spirochete (*B burgdorferi*).
J. Infect. dis. 1985, 152, 1, 108-117.
15. BECQ-GIRAUDON. B, BREUX. JP, AMIEL. A, BOUTAUD. P, HERPIN. D, DEMANGE. J, BARANTON. G
Un cas de MdL contracté en Afrique noire
Sem. Hom. Paris, 1987, 63, 1249-1250.
16. BENACH. JL, BOSLER. E.M, HANRAHAN. J.P.
Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease.
N. Engl. J. Med., 1983, 308, 740-742.
17. BERADI. V.P, WEEKS. KE, STEERE. AC
Serodiagnosis of early Lyme disease : Analysis of IgM and IgG antibody responses by using an Antibody-Capture Enzyme Immunoassay.
The journal of infections diseases oct. 1988, 158, 4, 754-760.
18. BINDER. E, DOEPFMER. R, HORNSTEIN. O
Übertragung des Erythema chronicum migrans von zu mensch in zwei passagen.
Klin Wochenschr, 1955, 33, 727-788.

19. BRES. P
Où va la recherche.
Impact médecin - Les dossiers du praticien n° 56.

20. BRYANT. J, MENNINGER. F, THORN. R, MARQUEZ. AY and E
Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* using a flagellin (P41)
depleted antigen preparation in an Enzyme immunoassay
Abstracts of the annual meeting - 1989.

21. BURGDORFER. W, BARBOUR. AG, HAYES. SF, BENACH. JL,
GRUNWALDT. E, DAVIS. JP
Lyme disease, a tick-borne spirochetosis ?
Science 1982, 216, 1317-1319.

22. BURGDORFER. W, BARBOUR. AG, HAYES. SF, PETER. O, AESCHLIMANN. A
Erythema chronicum migrans. A tick-borne spirochetosis.
Acta - Trop 1983, 40, 79-83.

23. BURGDORFER. W, KEIRANS. J.E.
Ticks and Lyme disease in the United-States
Ann. Intern. Med 1983, 99, 1, 121.

24. BURGESS. EC, AMUDSON. TE, DAVIS. JP, KASLOW. RA, EDELMAN. R
Experimental inoculation of peromyscus SPP with *B. burgdorferi* : Evidence
of contact transmission.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1986, 35 (2), 355-359.

25. CASALTA. JP, RAOULT. D

Sérologie

Impact médecin, Dossier 56.

26. COLEMAN. JL, BENACH. JL

Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete

Their role in early diagnosis

The journal of infectious diseases avril 87, 165, 4.

27. CORNUAU. C, BERNARD. M, DAUMAS. PL, OBLET. B, POIROT. G,
VALOIS. M

Les manifestations cardiaques de la maladie de Lyme. A propos de deux observations.

Ann. Cardio. Angiol 1984, 33, 6, 395-399.

28. CRAFT. JE, FISCHER. DK, SHIMAMOTO. GT, STEERE. AC

Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease

J. Clin. In Vest, oct. 1986, 78, 934-939.

29. CRICKX. B

Les signes cutanés de la maladie de Lyme.

Gazette médicale 1989, 96, 10, 41-44.

30. CULTER. SJ, WRIGHT. DJM

Comparison of Immunofluorescence and Enzyme Linked Immunosorbent Assay for diagnosing lyme disease.

J. Clin. Pathol. 1989, 42, 869-871.

31. DOBY. JM
Aspects épidémiologiques des spirochètoses à tiques
Gazette médicale 1989, 96, 10, 25-39.
32. DOURNON. E
Traitement de la maladie de Lyme
Gazette médicale 1989, 96, 10, 63-68.
33. DOURNON. E
Maladie de Lyme : Diagnostic biologique et traitement
La revue du Prat. mai 1989, 15, 1300-1303.
34. DOURNON. E
La maladie de Lyme
Beecham : Edition des Laboratoires Beecham
35. ELDINGER. E
Serodiagnostic de l'érythème chronique migrant
Médecine et maladies infectieuses 1985, 7, 368-371.
36. FISTER. RD, WEYMOUTH. LA, Mc LAUGHLIN. JC, RYAN. RW, TILTON. RC
Comparative evaluation of three products for the detection of *Borrelia burgdorferi* antibody in Human serum.
Journal of clinical microbiology, 1989, 2834-2837.
37. GASSMANN. GS, DEUTZMANN. R, VOGT. A, GOBEC. UB
N-terminal amino acid sequence of *B burgdorferi* flagellin
FEMS Microbiology letters 60, 1989, 101-106.

38. GARIN. CH et ses collaborateurs.
Paralysie par les tiques.
J. Med. Lyon 1922, 77, 765-767.
39. GRODZICKI. RL, STEERE. AC
Comparaison of immunoblotting and indirect Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay using different antigen preparations for diagnosing
early Lyme disease.
The journal of infections diseases
Avril 1988, 157, 4, 790-796.
40. GUESDON. JL
La méthode enzymo-immunologique aspects théoriques et pratiques
Technique et Biologie 1987, 3, 97-107.
41. GUY. EC, BATEMAN. DE, MARTYN. CN, HECKELS. JE, LAWTON. NF
Lyme disease : prevalence and clinical importance of *Borrelia burgdorferi*
specific IgG in forestry workers.
The lancet, march 4, 1989, 484-485.
42. HABICHT. G, BECK. G, BENACH. J
La maladie de Lyme
Pour la science, sept. 1987, 48-54.

43. HANRAHAN. JP et coll
Incidence and cumulative frequency of Lyme disease in a community
J. Infect. Dis., 1984, 150, 489-496.
- 44; HANSEN. K ASBRINK.E
Serodiagnosis of erythema migrans and acrodermatitis chronica
atrophicans by the B burgdorferi flagellum.
Enzyme - Linked Immunosorbent Assay.
Journal of Clinical Microbiology, Mar. 1989, 545-551.
45. HANSEN. K, HINDERSSON. P, STRANDBERG. N
Measurement of antibodies to the B burgdorferi flagellum improves
serodiagnosis in Lyme disease.
Journal of Clinical Microbiology, Feb. 1988, 338-346.
46. HECHEMY. KE
Lyme Disease : A review
Bull. Soc. Path. Ex, 79, 1986, 9-21.
47. HINDERSON. P, PEDERSON. N, AXELSEN. NH
Immunological cross-reactions between antigen Tp-4 of Treponema
pallidum and an antigen common to a wide range of bacteria
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect B 92, 183-188.
48. HOLLSTROM. E
Successful treatment of erythema migrans Afzelius
Acta Dermato. Venereol 1951, 31, 235,-243.

49. HOUGEN. KE
Ultrastructure of spirochetes isolated from *I ricinus* and *I dammini*
J. Biol. Med. (Yale), 1984, 93-98.
50. HYDE. FW, JOHNSON. RC
Genetic relation ship of Lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*
and *Leptospire*
J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 151-154.
51. JOHNSON. RL, HYDE. F.W, RUMPEL. CM
Taxonomy of the Lyme disease spirochetes
J. Biol. Med (Yale), 1984, 57, 529-537.
52. JOHNSON. R.C, KODNER. L, RUSSEL. M
In vitro and in vivo susceptibility of the Lyme disease spirochete *B.*
burgdorferi, to four antimicrobial agents.
Antimicrob. Agents chemother, 1987, 31, 164-167.
53. JOHNSON. R.C, SCHMID. GP, HYDE. FW, STEIGERWALT. AC, BRENNER. DJ
B. burgdorferi sp nov : etiologic agent of the Lyme disease.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1984, 34, 496-497.
54. KARLSSON. M, MOLLEGARD. I, STIERNSTEDT. G, WRETLIND. B
Comparaison of Western Blot and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for
diagnosis of Lyme Borreliosis.
Eur. J. Clin. Microbiol. infect. Dis. oct 1989, 871-877.

55. KOHLER. J, SCHNEIDER. H, VOGT. A
High-dose intravenous penicillin G does not prevent further progression in
early neurological manifestation of Lyme Borreliosis
Infection 1989, 17, 4, 216-217.
56. LECOMTE. F, HUMBERT. G
Les localisations viscérales de la maladie de Lyme
Gazette Médicale 1989, 96, 10, 53-58.
57. LE MINOR. L, VERON. M
Bactériologie médicale
Médecine et Science. Flammarion, ed. 1989.
58. LENNHOFF. C
Spirochaetes in aetiologically obscure diseases
Acta Derm. Venereol 1948, 28, 295-324.
59. LIPSCHUTZ
Uber eine seltene Erythemform (ECM)
Arch Dermatol 1913, 113, 349-356.
60. MAGNARELLI. LA
Laboratory diagnosis of Lyme disease
Rheumatic Disease Clinics of North America nov 1989, 15, 4, 735-745.
61. MAGNARELLI. LA
Qualité du diagnostic sérologique de la maladie de Lyme
JAMA, Fév. 1990, 15, 199, 241-242.

62. MAGNARELLI. LA, ANDERSON. JF, JOHNSON. RC
Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections.
The journal of Infectious Diseases, July 1987, 156, 1, 183-188.
63. MAGNARELLI. LA, MEEGAN. JM, ANDERSON. JF, CHAPPEL. WA
Comparison of an indirect fluorescent- antibody test with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serological studies of Lyme disease.
J.Clin. Microbiol, 1984, 20, 181-184;
64. MAZZONELLI. J, DUFRESNE. Y
Sérodiagnostic en immunofluorescence de la borréliose de Lyme avec la souche française IP.
Médecine et Maladies infectieuses, 1986, 4, 212-214.
65. MONTEIL. H, JAULHAC. B, PIEMONT. Y
Maladie de Lyme et infections à B burgdorferi en Europe.
Ann. Biol. Clin. 1989, 47, 428-437.
66. MURSIC. VP, WILSKE. B, SCHIERZ. G, HOLMBURGER. M, SUSS. E
In vitro and in vivo susceptibility of B burgdorferi
Eur. J. Clin. Microbiol, 1987, 6, 424,-426.
67. PACHNER. AR
Lyme disease
Tins, 1989, 12, 5, 177-181.

68. PEDERSEN. N, VEJTORP. M, AXELSEN. N.H.
Serodiagnosis of syphilis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for IgG antibodies against the Reiter treponeme flagellum.
Scand. J. Immunol. 1982, 15, 341-348.
69. PIESMAN. J, DONAHUE. JG, MATHER. TN, SPIELMAN. A
Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*B burgdorferi*) in field collected Larval I dammini.
J. Med. Entomol, 1986, 23, 2, 219.
70. QUENIN. P, RUAT. PH
Le diagnostic biologique de la maladie de Lyme : comparaison des techniques d'immunofluorescence et de l'immunoblotting, 1989.
71. RAOULT. D
Diagnostic biologique de la maladie de Lyme. Intérêt du Western Blot
Médecine et Maladie infectieuses, 1990, 20, 3, 163-164.
- 72; RAOULT. D, DRANCOURT. M
Sérologie de la maladie de Lyme
Gazette médicale 1989, 96, 10, 61.
73. RAOULT. D, HECHEMY. KE, LECAM. C, ENEA. M, TAMALET. J
Reactions croisées dans la maladie de Lyme.
La Presse Médicale, mars 1988, 17, 10, 485.

74. Rédaction du JAMA France.
Reproductibilité de la sérologie de la maladie de Lyme.
JAMA, Fév. 1990, 15, 199.
75. RODHAIN. F, PEREZ. C
Précis d'entomologie médicale et vétérinaire 1985, chap. 14-15-16, 322-383.
76. RODHAIN. F, PEREZ. C
Maladie de Lyme : Epidémiologie
Rev. Prat (Paris), 1989, 39, 15, 1291-1293.
77. RUEL. M, DOURNON. E
Intérêt de la standardisation
Ann de Med int. 1988, 39, 15, 1291-1293.
78. RUSSEL. H, SAMPSON. JS, SCHMID. GP. WILKINSON. HW PLIKAYTIS. B
Enzyme - Linked Immunosorbent Assay and Indirect Immunofluorescence Assay for Lyme disease.
J. Infect. Dis., 1984, 149, 465-470.
79. SCHILL. H, BUISSON. Y
Le diagnostic au Laboratoire de la maladie de Lyme
Bulletins et mémoires de la société de Médecine de Paris, 1989, 192
Tome XVII, 2, 37-38.

80. SCHMID. GP
The Global distribution of Lyme disease
Rev. Infect. Dis, 1985, 7, 1, 41-50.
81. SCHWAN. TG, BURGDORFERI. W, GARON. CF
Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, B burgdorferi as a result of in vitro cultivation.
Infect Immun, 1988, 56, 1831-1836.
82. SCHWARTZ. BS, GOLDSTEIN. MD, RIREIRO. JM, SCHULZE. TL, SHAHIED. SI
Antibody testing in Lyme disease. A comparison of results in four laborarories.
JAMA, dec 1989, 262, 24, 3431-3434.
83. SCRIMENTI. RJ
Erythema chronicum migrans
Arch Drematol, 1970, 102, 104.
84. SEYRAZ. P
La maladie de Lyme (traitement)
Impact médecin, dossier 56, XVII.
85. SONNECK. JM, LE CANIVELIE. G
Signes cutanés de la maladie de Lyme
Société de Médecine de Paris 1989, Tome XVII, 29-30.

86. SPIELMAN. A, CLIFFORD. CM, PIESMAN. J, CORWIN. MD
Human babesiosis on Nantucket et Island, USA
Description of the vector *I. dammini*
Journal of Medical Entomology, 1979, 15, 212-234.
87. SPIELMAN. A, LEVINE. JF, WILSON. ML
Vectorial capacity of North America Ixodes ticks
J. Biol. Med. (Yale) 1984, 57, 507-513.
88. STEERE. AC et Coll
The early clinical manifestation of Lyme disease.
Ann Intern. Med., 1983, 99, 76-82.
89. STEERE. AC
Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of
Lyme disease in a defined population.
J. Infect. Dis. 1986, 154, 295-300.
90. STEERE. AC
Medical Progress : Maladie de Lyme
The New England Journal of Medicine, Aug. 1989, 586-596.
91. STEERE. AC BRODERICK. TF, MALAWISTA. SE
Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis : epidemiologic evidence
of a tick vector
Am. J. Epidemiol 1978, 108, 312-321.

92. STEERE. AC, GIBOFSKY. A, PATARROYO. ME, WINCHESTER. RJ, HARDIN. JA, MALAWISTA. SE
Lyme arthritis immunologic and immunogestic markers.
Arthritis and Rheumatism, 1979, 22, 6, 662.
93. STEERE. AC, MALAWISTA. SE
Cases of Lyme disease in the United States :
Locations correlated with distribution of I dammini.
Ann. Intern. Med 1979, 91, 730-733.
94. STEERE. AC, MALAWISTA. SE, SYNDMAN. DR
Lyme arthritis : an epidemic of oligoarticular arthritis in children an adults
in three Connecticut communities.
Arthritis and Rheumatism, 1977, 20, 7-17.
95. STIERNSTEDT. G, BARBOUR. AG, HOVIND-HOUGEN, HANSSON. LD,
SVENUNGSSON. B, JORBECK. H, STOLDENBERG. B
Borrelia strains isolated from Ixodes ricinus in Sweden studies on their
ultrastructure and reactivities with antibodies of patients with spirochetal
meningitis.
In Press. Pris dans Thèse pharmacie, Bordeaux, 1988 de Vilagleck : A
propos d'une entité médicale récente, la MdL.
96. VARGUES. R, GOUDEAU. A, DENIS. F
Principe généraux des Techniques immunologiques.

97. VEYSSIER. P

Manifestations cliniques de la maladie de Lyme.

La Revue du praticien, Leptospires et Borrelioses, 1989, 39, 1, 1294, 1299.

98. VIEYRES. CH

Maladie de Lyme : Etude des aspects européen à propos de huit cas observés au CHU de Poitiers.

Thèse Médecine de Poitiers, 1987.

99. WAYNE. LG, BRENNER. DJ, COLWELL. RR, GRIMONT. PAD ET AL

Report of the ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic

Int. J. Syst. Bact 1987, 37, 4, 463-464.

100. WILSKE. B, PREAC-MURSIC. V, SCHIERZ. G, VON BUSCH. K

Immunochemical and immunological analysis of European Borrelia burgdorferi strains.


Zentralbl Bakteriол. Hyg. 1986, 263, 92-102.



A U T O R I S A T I O N D ' I M P R E S S I O N

De la Thèse dont l'intitulé est : *Interet de l'ELISA dans
le diagnostic serologique de la maladie de
LYME au stade cutané.*

CANDIDAT : M HAFOTA . ALBERT .


Pr. René GRILLON
U.F.R. Pharmacie

Le Président du Jury

VU

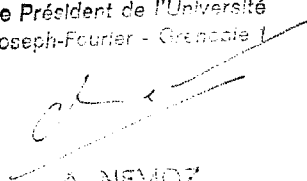
GRENOBLE, le *11 Février 1991.*

VU

Le Président de l'Université
Joseph FOURIER GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine

GRENOBLE, le *15.02.91*

Le Président de l'Université
Joseph-Fourier - Grenoble I


A. NEMOZ

