



LES TESTS DE DEPISTAGE DES MALADIES VECTORIELLES A TIQUES

Les maladies vectorielles à tiques sont en augmentation dans le monde entier. La maladie de Lyme est la maladie vectorielle à tiques la plus prévalente aux Etats-Unis et en Europe, et atteint des niveaux épidémiques (Kugeler et al. 2015; Sykes et al. 2014).

Alors que les tiques ont la capacité de transmettre un certain nombre de pathogènes qui causent des maladies humaines, la maladie de Lyme est la plus connue des maladies vectorielles à tiques. Elle est causée par la bactérie du genre *Borrelia*, en particulier la *Borrelia burgdorferi*, qui est une bactérie spirochète à gram - (gram négatif). Les spirochètes sont un groupe de bactéries phylogénétiquement distinctes dont les filaments axiaux (endoflagelles) permettent la motilité.

Le genre *Borrelia* comprend plusieurs espèces parmi lesquelles les plus communes incluent les *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* et la *B. miyamotoi*, récemment identifiée.

La borrelie *B. burgdorferi* envahit le sang et les tissus de divers mammifères et oiseaux infectés par l'intermédiaire d'une morsure de tique du genre *Ixodes*. La souris à pattes blanches est considérée comme le réservoir naturel de la borrelie *B. burgdorferi*. Une fois qu'elle a acquis les spirochètes d'un animal infecté, la tique les transfère à des cerfs, des humains, et autres animaux à sang chaud. Pour la plupart des mammifères, y compris les humains, l'infection par *B. burgdorferi* peut entraîner la maladie de Lyme, mais les porteurs sains peuvent exister (par exemple, toute personne piquée par une tique ne tombe malade). Cependant, il est à noter que toutes les espèces de borrelies sont reconnues capables de causer des maladies, et 21 d'entre elles sont associées à la maladie de Lyme.

Il est important de garder à l'esprit que la maladie de Lyme peut être aiguë (elle se manifeste alors rapidement après une morsure de tique) ou

tardive/persistante/chronique (elle se manifeste/persiste après la morsure initiale; Donta 2002). Certains ont essayé de séparer la maladie de Lyme ‘tardive’ de la maladie de Lyme ‘chronique’. La première se manifeste par des signes objectifs d’arthrite et la maladie neurologique (Wormser et al. 2000). Certains ont dénié l’existence de la maladie chronique, inférant que les patients devaient souffrir de désordres psychiatriques. Certains ont utilisé le terme ‘chronique’ pour les maladies suivant le traitement (“post-Lyme“), assumant que l’infection a été traitée, et que les symptômes restants sont dans le domaine de ceux des gens souffrant de “fibromyalgie” ou “fatigue chronique” (Seltzer et al. 2000; Steere AC 2001). Le fait que cette maladie de Lyme chronique existe, et est probablement la forme la plus courante de la maladie, est soutenu par des études épidémiologiques démontrant que 30 à 50% des patients traités et non-traités développent ensuite un désordre multi-symptomatique typique de la fibromyalgie et de la fatigue chronique, et indifférenciable de celles-ci.

La distinction entre la maladie aigüe et tardive/chronique/persistante est importante, vu que le diagnostic et les approches de traitement sont différents dans ces deux situations.

Etant donné le nombre de co-infections possibles (par exemple les infections vectorielles à tiques - IVT) transmises par les tiques (telles que la Bartonella, la Babesia, l’Anaplasma, l’Ehrlichia, le Rickettsia, etc), il est plus correct de parler de maladies vectorielles à tiques plutôt que de maladie de Lyme, qui ne représente que l’infection par la borrelia. Le terme “maladie de Lyme” est très fréquemment employé pour les maladies transmises par les tiques. Le Dr Horowitz a néanmoins proposé que les infections persistantes/chroniques de Borrelia et autres co-infections soient désignées par le terme “Lyme-SMIMS” (Syndrome de Maladie Infectieuse Multi-Systémique).

La borreliose de Lyme est une maladie multi-systémique avec des manifestations diverses qui rendent le diagnostic clinique difficile. La maladie de Lyme présente une variété de symptômes qui peuvent être confondus avec des désordres immunitaires et inflammatoires (voir le livre du Dr Horowitz “Pourquoi je ne guéris pas? - Soigner Lyme et les maladies inexplicables”). Des questionnaires (celui du Dr Horowitz ou celui proposé sur le site <http://www.associationlymesansfrontieres.com/questionnaire-lyme/>) sont disponibles pour les patients et médecins de façon à prendre en compte ces symptômes multiples. Un nouveau questionnaire révisé, appelée QSH (questionnaire du SMIMS du Dr Horowitz, validé sur plus de 1600 patients),

est publié dans le nouveau livre du Dr Horowitz (« *How can I get better* »).

L'inflammation autour de la morsure de tique cause des lésions dermales. L'érythème chronique migrant (ECM), une lésion dermale unique se répandant à partir d'un centre clair, encerclé par un anneau rouge, donnant l'apparence d'un œil de boeuf, est typiquement le premier signe de la maladie. L'arthrite, ainsi que les maladies neurologiques et cardiaques peuvent se manifester à des stades plus tardifs. Alors que le traitement précoce des infections primaires aiguës est simple, les patients identifiés plus tard peuvent souffrir de Lyme chronique et de conditions associées, qui sont beaucoup plus difficiles à diagnostiquer et traiter.

Il est aussi important de garder à l'esprit que le médecin doit dresser une image clinique complète. Diagnostiquer la maladie de Lyme et les maladies vectorielles à tiques (MVT) qui lui sont associées représente un grand défi. Les complications d'un diagnostic d'IVT résultent de tests inadéquats. Les cas de Lyme sont souvent diagnostiqués à tort en tant qu'autres maladies et même quand un diagnostic correct est établi, il est souvent difficile à le valider car des tests fiables ne sont pas toujours disponibles. C'est pour cela que les médecins basent leur diagnostic sur la présence de la lésion 'œil de bœuf' classique sans chercher à le confirmer avec des tests supplémentaires. D'autres médecins demandent une confirmation de laboratoire avant de commencer un traitement. Très peu de tests pour les MVT sont approuvés pour un diagnostic clinique et par conséquent la plupart des options de tests disponibles sont des tests « de recherche » dont l'objectif est d'aider à évaluer les patients présentant des symptômes ressemblant à ceux de la maladie de Lyme.

Non seulement les tests en laboratoire aident à diagnostiquer une maladie, mais ils permettent aussi de gérer la maladie et le suivi des traitements. Un bon test peut aider le médecin à établir le degré de la sévérité d'une maladie, en suivre la progression, stabilité, résolution ou rechute, et sélectionner les médicaments ou ajuster les thérapies. Il n'existe pas de test avec ces capacités pour la maladie de Lyme. Bien que l'on ait investi beaucoup d'énergie et d'argent pour améliorer l'efficacité des tests, ceux-ci restent néanmoins très décevants. Il y a plusieurs raisons à cela, mais la plus significative est liée à la nature même de ces agents infectieux, qui ont développé de multiples stratégies afin de pouvoir éviter d'être repérés par le système immunitaire. Les tests les plus courants sont basés sur la sérologie, mais beaucoup de patients ne produisent pas d'anticorps, et obtiennent par conséquent un résultat négatif.

Il y a de nombreuses raisons pour lesquelles les anticorps ne sont pas observés quand une personne a une infection de Lyme active, parmi lesquelles : (i) le test est fait trop tôt (pour une infection aiguë), (ii) la salive de la tique contient des composantes spécifiques réprimant l'immunité, empêchant l'activation du système immunitaire, (iii) quand les borrelies sont enkystées, il n'y a pas de synthèse de composants de surface permettant de produire des anticorps, etc. De plus, étant donné le nombre de souches identifiées (et il est fort possible que toutes les souches ne l'aient pas encore été), les tests disponibles ne sont pas tous inclusifs, donc si un patient est infecté par une souche non comprise dans le test, le résultat sera négatif. Tout cela souligne le rôle clé d'un médecin spécialisé qui sache utiliser des connaissances poussées en combinaison avec de bons tests et résultats de laboratoire. Une compréhension générale des limites et de la signification d'un diagnostic donné est de la plus haute importance.

La plupart des méthodes diagnostiques disponibles à ce jour sont présentées ci-dessous. Elles concernent les évaluations de maladies aiguës et chroniques. Une partie séparée est dédiée à la maladie chronique/persistante. Elle démontre le besoin d'une approche plus large basée sur les symptômes multiples présentés par les patients chroniques.

MICROSCOPIE

Il s'agit de l'examen d'un échantillon de sang ou de tissu, en utilisant un microscope de haute définition pour détecter directement la présence de spirochètes. C'est une technique longue et peu sensible quand on utilise le sang en raison du nombre très bas de borrelies dans le sang, particulièrement au stade précoce de l'infection. Si toutefois on a recours à cette technique, il est préférable d'utiliser le sang périphérique, vu une concentration plus élevée des bactéries au bout des doigts. Très peu d'essais cliniques utilisant cette technique ont été effectués, rendant l'intérêt de cette technique plus difficile à établir pour l'analyse des patients en tout début d'infection ou en période de rechute. Par ailleurs, pour pouvoir se fier à cette technique, il serait nécessaire d'exclure la présence d'autres maladies à spirochètes.

La "*focus floating microscopy*" a été développée pour détecter les spirochètes dans des échantillons de tissus mais n'a pas été utilisée en dehors des laboratoires de recherche et présente une difficulté pratique due au fait que les tissus potentiellement infectés doivent être identifiés et biopsés.

DETECTION PAR CULTURE

En raison des besoins fastidieux requis pour la croissance des borrelies *in vitro*, ces organismes sont difficiles à développer en cultures, et même en présence de conditions optimales, leur multiplication est très lente. Par conséquent, la culture de ces bactéries en tant qu'outil diagnostique n'est pas pratique pour la maladie de Lyme, particulièrement pour deux raisons : d'abord, les borrelies ont évolué pour se propager dans un hôte. Par conséquent, leur culture se heurte à des difficultés, et ces méthodes ne sont souvent pas reproductibles avec suffisamment de rigueur clinique. Deuxièmement, parce que leur croissance est lente, la période nécessaire pour obtenir des résultats est au-delà du raisonnable.

BIOPSIE

Environ 60 à 80% des spécimens isolés à partir de la ligne extérieure d'une lésion supposée être un érythème migrant avec une aiguille d'aspiration contenant du sérum physiologique ou une biopsie à ponction révèlent la présence de *B. burgdorferi*. Bien que la présence d'une lésion, combinée à un historique de confirmation et une présentation clinique, soit suffisante pour démarrer un traitement, ces procédures de biopsies dermales sont rarement utilisées.

SEROLOGIE

Le système immunitaire humain produit des anticorps spécifiques par réaction aux substances étrangères présentes dans le corps. Par conséquent, les tests basés sur la présence d'anticorps identifient ces anticorps spécifiques qui sont produits par réaction contre les infections bactériennes. Les examens sanguins qui identifient les anticorps spécifiques à la *B. burgdorferi* comptent parmi les outils diagnostiques les plus communs pour la maladie de Lyme. Ces méthodes de diagnostic sont appelées 'sérologie'. Si la réponse immunitaire médiée par les anticorps ne s'est pas suffisamment développée, il est possible que ces tests aboutissent à un résultat négatif, malgré la présence d'une infection active. Inversement, les anticorps peuvent persister pendant des

années après les traitements, et par conséquent, même en l'absence d'une infection active, les patients asymptomatiques peuvent produire un résultat sérologique positif.

Les tests de laboratoire distinguent deux classes d'anticorps : les IgM et les IgG.

- les anticorps IgM de *Borrelia* (immunoglobulines M) sont en général détectables dans le sang environ deux à trois semaines après l'exposition. Les niveaux d'IgM atteignent des concentrations maximum à environ six semaines et commencent ensuite à décliner.

- Les anticorps IgG de *Borrelia* ne sont pas détectables pendant plusieurs semaines après l'exposition, et atteignent des niveaux maximum environ quatre à six mois plus tard. Ils peuvent ensuite rester à des niveaux élevés pendant plusieurs années.

Il est à noter que *B. burgdorferi*, par un procédé de recombinaison de gènes, peut modifier ses antigènes de surface, créant des antigènes de surface différents, permettant d'éviter leur détection par le système immunitaire, menant ainsi à des résultats faux-négatifs.

Les deux tests basés sur la méthode d'anticorps les plus utilisés sont l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, = méthode immuno-enzymatique), et le 'Western Blot' (immunoblot).

Pendant les premières quatre à six semaines de l'infection de Lyme, les tests ne sont souvent pas fiables car la plupart des patients n'ont pas encore développé les anticorps, qui ne seront donc pas détectés par le test. Même plus tard au cours de la maladie, le test en deux volets est très insensible, manquant de détecter à peu près la moitié des personnes atteintes de la maladie de Lyme.

Les tests en deux volets pour la maladie de Lyme consistent en un test de dépistage (ELISA), qui dans l'idéal devrait identifier toute personne atteinte de la maladie de Lyme. Typiquement, les tests de dépistage sont conçus pour identifier tous les individus infectés, et sont considérés comme hautement sensibles. Cependant, ces tests produisent souvent des faux positifs. C'est pour cela que ce test est suivi par un second test confirmatoire (immunoblot) dont l'objectif est d'établir avec certitude que seuls les malades atteints de la

maladie seront diagnostiqués. Les tests qui font bien cela ont une spécificité très élevée.

En ce qui concerne la maladie de Lyme, le second test (le Western Blot) est hautement spécifique, à condition que l'infection ait eu pour résultat une production d'anticorps. Il y a donc très peu de faux positifs. Malheureusement, le test de dépistage de la maladie de Lyme est très insensible et n'identifie pas avec précision tous les patients atteints de la maladie de Lyme. C'est pour cela que le test en deux volets faillit à identifier environ 54% des patients infectés (Stricker & Johnson 2010).

La sérologie est à l'heure actuelle la méthode diagnostique la plus utilisée pour la maladie de Lyme. Un test sérologique positif suggère seulement que le patient a été exposé au pathogène, et n'est pas un diagnostic d'infection active. L'utilisation du test ELISA en dépistage, suivi en cas de résultat positif d'un test confirmatoire Western Blot n'est pas une approche adéquate. L'ELISA n'est pas assez sensible pour servir en tant qu'outil de dépistage, et de nombreux patients qui ont eu un résultat négatif avec l'ELISA ont obtenu un diagnostic de maladie de Lyme avec le Western Blot. Le test ELISA est le plus simple, le moins cher, le plus facile à utiliser, et le test pour Lyme le plus utilisé. Le test pour la maladie de Lyme typique est basé sur la détection d'anticorps produits par réaction à l'exposition à la *Borrelia burgdorferi*. C'est le test de choix en laboratoire, non pas pour sa fiabilité mais parce qu'il est facilement automatisé. Par conséquent, de nombreux échantillons de différents patients peuvent être traités en même temps. Cela permet un rendement plus élevé, des coûts moindres, et théoriquement, des résultats de tests standardisés d'un laboratoire à l'autre. De prime abord, le test ELISA semble simple et sans complications, mais il a de sérieuses failles. Les espèces de borrelia sont parmi les bactéries les plus polymorphes connues. En d'autres termes, la plupart des borrelies peuvent changer leurs protéines de surface de façon significative pendant la division de leurs cellules, à tel point qu'elles échappent au système immunitaire et peuvent différer suffisamment des souches utilisées en laboratoires pour aboutir à un résultat faux négatif même en présence d'anticorps!

Tom Grier, microbiologiste et ancien patient de Lyme, a écrit de nombreux articles sur les tests relatifs à la maladie de Lyme. Il présente une analyse très convaincante de la raison pour laquelle le test ELISA est imprécis : "Le test ELISA dépend des anticorps libres actifs, qui doivent s'attacher sur les antigènes libres qui se sont encastrés dans les parois des éprouvettes. Si les

anticorps dans le sérum testé sont déjà attachés aux antigènes, la réaction des enzymes ne peut avoir lieu. Imaginons que les anticorps soient des clés dans une serrure, et qu'à la surface des bactéries se trouvent des serrures spécifiques que nous appelons antigènes. Vous voyez bien qu'une fois qu'une clé est insérée dans une serrure, elle n'est pas disponible pour s'insérer dans les autres serrures. Ce qui rend ce test si trompeur, c'est le fait que les médecins acceptent que des valeurs élevées indiquent que la personne doit être très malade. Cette logique est extrêmement rétrograde. Si un patient est réellement infecté par de nombreuses bactéries, cela veut dire qu'il a de nombreux antigènes de bactéries flottant dans le sang fixant des anticorps libres. Donc, comme les antigènes libres augmentent, les anticorps libres décroissent. Puisque le test ELISA ne détecte que les anticorps libres, un test négatif peut indiquer une infection plus sérieuse. J'ai de nombreuses fois vu des patients totalement asymptomatiques avec les titres ELISA à plus de 1000 être traités comme s'ils étaient mourants simplement parce qu'ils avaient un titre élevé, alors que des patients avec des titres 'limite' qui étaient pratiquement handicapés étaient ignorés, parce qu'un titre bas était perçu comme voulant dire moins infecté! Ces conclusions sont erronées et contraires à la vérité, qui est en fait qu'un titre élevé veut dire une plus grande immunité. »

Le Western Blot est spécifique car il fournit une carte détaillée de différents anticorps produits par le système immunitaire en réaction à la bactérie. La carte sépare les anticorps par le poids de leurs antigènes respectifs (protéines bactériennes), et est exprimée en unités appelées kilodaltons ou kDa. Par exemple, un Western Blot peut distinguer des bandes à 22-, 23-, 25-, 31-, 34-, 39-, et 41- kDa. Chacune de ces bandes représente une réaction d'anticorps à une protéine spécifique trouvée sur une spirochète. La bande 41-kDa indique un anticorps à la protéine de flagelle 41-kDa et est non spécifique par rapport à l'espèce de bactérie. La bande 31-kDa représente la protéine OSPA et est spécifique uniquement pour quelques espèces de borrelies, tout comme la bande 34-kDa OSPB, et la bande 23-kDa OSPC.

Le rapport du Western Blot montre quelles bandes sont réactives. La bande 41-kDa apparaît la première dans le développement de la maladie mais peut réagir en croisement avec d'autres spirochètes. Les bandes 18-kDa, 23 à 25-kDa (Osp C), 31-kDa (Osp A), 34-kDa (odp B0, 37-kDa, 39-kDa, 83 kDa et 93-kDa, sont des bandes spécifiques de différentes espèces, mais apparaissent plus tard ou peuvent ne pas apparaître du tout. On devrait voir au moins la bande 41-kDa et une des autres bandes spécifiques.

Les bandes 55-kDa, 60-kDa, 66 kDa, et 73 kDa sont non spécifiques et sans

valeur diagnostique. Des marques différentes d'immunoblot de borrélioses sont disponibles. Le kit de Mikrogen détecte des anticorps contre quatre espèces (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis* sur une bande de test simple :

- VlsE de différentes espèces
- OspC de toutes les espèces
- p18 (Protéine liante de Decorin A = DbpA) des 4 espèces à la fois

Les avantages de l'utilisation de cette méthode, assumant que le patient avait développé des anticorps, sont la grande sensibilité et sa spécificité, l'interprétation facile et claire grâce aux bandes faciles à lire, la présentation optimale sans une réaction croisée avec des protéines de borrélioses, les antigènes immunodominants de quatre espèces : *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis*, la détection séparée des anticorps IgG et IgM, et l'évaluation sûre grâce aux contrôles spécifiques aux bandes (contrôle de 'cut-off' et conjugué). Par conséquent, dans le cas où le patient a pu développer des anticorps, ce test révélera leur présence de façon la plus optimale. Cependant, dans le cas où le patient ne produit pas d'anticorps, ce test restera négatif malgré l'infection. Afin de s'assurer que les bandes les plus spécifiques soient incluses dans l'immunoblot, il serait recommandé aux patients de demander au laboratoire quels antigènes sont inclus dans le test et de leur fournir le rapport complet, pas seulement le résultat final (positif/limite/négatif).

Une attention particulière est accordée à *B. miyamotoi*, qui ne produit pas de réaction croisée avec les tests de *B. burgdorferi* (Brenda & Rosenberg 2013; Lee et al. 2014). *B. miyamotoi* pourrait peut-être être détecté par PCR ou par EliSpot.

Enfin, un nouveau test sérologique pour la maladie de Lyme, appelé SeraSpot, a été commercialisé avec une très grande publicité. Il est très similaire au Western Blot mais s'adapte bien à l'automatisation et, par conséquent, à un niveau élevé de données, permettant donc une évaluation plus rapide en laboratoire clinique. Vu que les deux approches permettent la quantification, il n'y a pas vraiment d'amélioration constatée entre un test basé sur la sérologie avec SeraSpot et le Western Blot, à partir du moment où le Western Blot contient des antigènes très spécifiques, tels que le kit Mikrogen, utilisé dans plusieurs laboratoires, ou le diagnostic de IgeneX.

Un problème majeur pour le diagnostic de la maladie de Lyme est le fait qu'aucun examen sanguin ne peut donner de résultat absolu. Deux des tests les plus utilisés, l'ELISA et le Western Blot, reposent sur la présence d'anticorps produits contre la *Borrelia*. Malheureusement, les résultats de ces tests peuvent être inexacts et les méthodes d'analyse ne sont pas toujours les mêmes d'un laboratoire à l'autre. Le test ELISA peut produire un résultat faussement négatif s'il est fait trop tôt, et le Western Blot devrait toujours être utilisé pour confirmer un résultat positif au test ELISA. Les deux tests détectent une infection indirectement en réagissant aux anticorps dans le sérum sanguin. Cependant, la présence d'anticorps ne signifie pas toujours qu'une infection est présente, mais elle indique l'exposition à un agent infectieux. Inversement, l'absence d'anticorps ne peut pas absolument confirmer l'absence d'une infection.

Pour finir, les bactéries de Lyme peuvent s'attacher à des protéines, masquant ainsi les protéines auparavant reconnues par les anticorps. Elles sont aussi capables d'entrer dans les cellules du système nerveux et du système immunitaire. Une fois à l'intérieur d'une cellule, elles ne sont plus accessibles pour la liaison d'anticorps. Il est important de savoir que la Borréliose est une maladie immunosuppressive qui peut empêcher la production d'anticorps. Par conséquent, alors que le Western Blot pourrait détecter des anticorps spécifiques à la maladie de Lyme, il n'a pas plus d'utilité que le test ELISA une fois que le corps a cessé de produire des anticorps.

LE TEST ELISA C6

Le C6 est un peptide synthétique (C6 peptide) dérivé de la protéine VISe qui apparaît dans la maladie de Lyme à son stade précoce aussi bien qu'à son stade tardif. Le test identifie la présence d'anticorps contre ce peptide synthétique. Cependant, la sensibilité est déclarée n'être que de 70 à 74%, donc plus basse que celle d'un Western Blot complet incluant des antigènes hautement spécifiques (bandes 23, 31, 34, 39, 83-93-kDa). Il est donc prudent d'effectuer un Western Blot de confirmation. Sachant cela, il est plus efficace et moins coûteux de n'effectuer que le Western Blot. De plus, Embers et al. (PloS One 2012) ont démontré que le test des anticorps aux peptides C6 n'est pas capable de détecter une infection persistante, même quand les autres méthodes confirment une présence bactérienne dans les tissus de singes infectés. Par conséquent, il a été démontré que le test d'anticorps aux peptides C6 était un outil diagnostique non fiable pour les singes traités et non traités, étant donné qu'un résultat positif pouvait devenir négatif.

COMPTAGE DE CELLULES CD57

Dans les borrélioses de Lyme chroniques, le comptage de cellules CD57 est à la fois utile et important. Les cellules CD57+/CD3- sont un sous-groupe des cellules tueuses (NK) naturelles. Les cellules NK ont une fonction cruciale dans l'immunité innée, reconnaissant et tuant les cellules infectées par des virus et les cellules tumorales. Dr Stricker et ses collaborateurs (Stricker & Winger 2001; Stricker et al. 2002) ont rapporté que le nombre de cellules CD57+/CD3- était diminué dans la maladie de Lyme chronique (non aigüe). Alors que les infections aigües peuvent être traitées par des antibiotiques, l'absence de traitement peut entraîner une maladie chronique, débilitante, caractérisée par des symptômes musculo-squeletaux et neurologiques. La maladie de Lyme chronique peut être difficile à traiter mais aussi à diagnostiquer (Aguero-Rosenfeld et al. 2005).

Le nombre des cellules CD57+/CD3- diminue chez les patients atteints de la maladie de Lyme chronique, particulièrement chez ceux ayant des symptômes neurologiques prononcés. Les patients avec un bas niveau de CD57 auraient un nombre plus significatif de co-infections et de dysfonctionnements immunologiques persistants que les patients avec un niveau plus élevé. Chez les patients qui réagissent bien à une thérapie antibiotique, le niveau redeviendra normal après le traitement, tandis que chez les patients qui ont une maladie de Lyme persistante, les niveaux de CD57 resteront bas. Le test est basé sur une cytométrie en flux en trois couleurs. Le nombre absolu de lymphocytes CD57-positif/CD3- négatif (cellules/ μ l de sang) est déterminé par la cytométrie en flux. Le résultat indique le nombre absolu de cellules CD57+/CD3- (cellules/ μ l). Le niveau normal est 60-360 cellules/ μ l. Non traitée, la maladie de Lyme chronique se caractérise par des valeurs en-dessous de 60.

Il est à noter que la diminution du nombre des cellules CD57 a aussi été mise en évidence pour les enfants autistes (Siniscalco et al.2016). Cela peut aussi montrer l'importance des maladies infectieuses multiples dans les désordres du spectre de l'autisme.

TEST DE TRANSFORMATION DES LYMPHOCITES

Le test de transformation des lymphocytes (TTL) a été développé à l'origine dans les années 1960 pour évaluer l'histocompatibilité des antigènes de la

classe II HLA. La méthode a ensuite été modifiée pour caractériser les antigènes de classe II et aussi appliquée à grande échelle pour détecter les allergies aux médicaments, métabolites, organismes infectieux, et métaux. La TTL est devenue un mode de détection courant pour les allergies au béryllium, nickel, or, cobalt, chrome et palladium.

Les tests sont spécifiques aux antigènes, pas aux anticorps, et sont considérés plus fiables pour les diagnostics de Lyme, en particulier pour les infections actives et progressives.

1. TTL MELISA

En 1994, Stejskal et ses collègues ont publié une modification du test TTL pour détecter les sensibilités au métal - le test MELISA. La technologie MELISA est maintenant appliquée pour diagnostiquer la maladie de Lyme active (Valentine-Thon et al. 2006). Une réaction positive au test Melisa démontre une infection active par *Borrelia burgdorferi sensu lato*. En plus des quatre antigènes recombinants habituels dérivés des *B. afzelii* et *B. garinii*, le test inclut en général trois antigènes supplémentaires dérivés des *B. burgdorferi sensu stricto* (OspC, une protéine de surface extérieure recombinante, p41, un fragment recombinant interne, et un antigène du lysat complet). Le test MELISA est un test de transformation de lymphocytes, qui ne détecte pas les anticorps mais les caractéristiques d'immuno-réactivité cellulaire des infections actives de *Borrelia burgdorferi*. Le test améliore le diagnostic de laboratoire en confirmant la maladie active des patients avec les symptômes cliniques de Lyme. Ce test est basé sur l'utilisation de cellules mononucléaires de sang périphérique, incubées avec des contrôles, dans une plaque de culture recouverte d'antigènes recombinants de borrelies à trois dilutions pendant 5 jours à 37° avec une atmosphère de 5% de carbone dioxyde. Si les lymphocytes ont auparavant rencontré des antigènes, les cellules vont se diviser et cette division est mesurée par l'absorption de methyl-3H-thymidine radioactif. Le TTL-MELISA peut mesurer l'activité de la maladie dans les patients infectés qui n'ont pas développé une réaction d'anticorps adéquate. Cependant, il est recommandé d'effectuer un Western Blot en parallèle, étant donné que certains patients positifs par le Western blot ont obtenu des résultats négatifs avec le TTL-MELISA (Puri et al. 2014).

2. L'ÉLISPOT-TTL ET LE LYMESPOT-TTL RÉVISÉ

L'EliSpot (Enzyme-linked Immunosorbent Spot Assay) mesure le nombre de Lymphocytes-T actifs dans les cultures de cellules, basé sur leur sécrétion de

cytokines quand elles sont défiées par un antigène actif. A l'heure actuelle, il n'existe que quelques publications disponibles à ce sujet et leurs conclusions divergent en ce qui concerne la maladie de Lyme (Forsberg et al. 1995; Nordberg et al. 2012; Jin et al. 2013).

L'Elispot (Interferon γ -test) est un test pour détecter une infection, au niveau cellulaire, par la *Borrelia* et/ou des co-infectants.

Alors que le test Elispot existant est exclusivement basé sur la production d'interferon- γ , le nouveau test LymeSpot évalue également la production de l'interleukin (IL-2). Si le ratio entre l'interferon- γ et l'IL-2 est inversé, on peut supposer une maladie latente.

De plus en plus de laboratoires effectuent des tests TTL pour la *Borrelia* et certaines co-infections. Mais, comme pour les Western Blot, il est très important de savoir quels antigènes sont utilisés pour les tests. Il faut donc demander la liste des antigènes utilisés et vérifier leur spécificité et la liste des espèces couvertes. Tous les laboratoires n'utilisent pas des antigènes multiples. Aussi, il est important de savoir que le test EliSpot serait positif en cas de maladie active et négatif dans les cas « chroniques » sans activité en cours au moment où le test est effectué.

LES TESTS PCR

Cibler l'ADN en utilisant la réaction de polymérase en chaîne (PCR) peut être utile car c'est une mesure directe des pathogènes, et elle n'est pas basée sur la sérologie indirecte.

La PCR est un test de biologie moléculaire qui amplifie une portion clé de l'ADN d'une bactérie de façon à ce qu'elle puisse être détectée. Alors que la PCR est hautement précise quand l'ADN de *Borrelia* est détecté, elle produit de nombreux faux négatifs. C'est parce que la bactérie est clairsemée et peut ne pas se trouver dans l'échantillon testé. Au lieu d'identifier les anticorps à la bactérie *Borrelia*, la PCR est une mesure directe de la présence de l'organisme lui-même. Malheureusement, les tests PCR produisent couramment des faux négatifs parce que les borrelies ne résident dans le sang que pendant de très courtes périodes, préférant s'installer dans les tissus à circulation vasculaire réduite.

La PCR est une méthode spécifique et sensible pour la détection rapide et directe de *B. burgorferi*. Elle a démontré son utilité pour la détection de l'ADN

de borrélioses à partir de biopsies cutanées en cas de lésions ECM (Erythème Chronique Migrant) ainsi que celle de l'ADN à partir de fluide synovial et cérébrospinal dans les phases tardives de la maladie. L'ADN de borrélioses peut également être détecté dans le sang mais les résultats devraient être corrélés avec la présentation des symptômes cliniques du patient. Étant donné les limites de la sensibilité clinique du test PCR, un résultat négatif n'empêche pas la présence de l'organisme ou de la maladie de Lyme active. D'autre part, un résultat négatif n'exclut pas la maladie de Lyme puisque les substances inhibitrices peuvent être présentes dans l'échantillon. Grâce à une bonne conception d'amorce de PCR, de multiples espèces peuvent être détectées en un seul test ou, inversement, les amorces peuvent être conçues pour identifier une espèce particulière. Les résultats de tests PCR devraient être utilisés en tant qu'aide au diagnostic plutôt que de représenter un diagnostic en eux-mêmes. Ces résultats devraient être corrélés avec la présentation des symptômes cliniques des patients. Des infections concurrentes avec de multiples pathogènes portés par les tiques, y compris la *Bartonella*, l'*Ehrlichia chaffeensis*/*Anaplasma phagocytophilum* et la *Babesia microti* ont été signalées et des tests pour d'autres pathogènes devraient être considérés si les symptômes cliniques les indiquent.

Bien que la PCR soit une méthode intrinsèquement sensible et spécifique, les résultats sont fréquemment négatifs même si le patient est infecté. C'est typiquement la conséquence d'un manque de bactéries dans les échantillons testés. L'ADN de borrelia peut être indétectable dans le sang car quand la *Borrelia* est présente dans les tissus, ou en forme de kyste, elle relâche rarement du matériel génétique dans la circulation. De plus, les individus touchés par la maladie de Lyme ont fréquemment des périodes pendant lesquelles ils sont symptomatiques et d'autres pendant lesquelles ils sont asymptomatiques, ce qui reflète l'activité des bactéries. Le test PCR peut revenir positif ou négatif, en fonction du niveau d'activité de l'infection. Aux stades tardifs de la maladie, il est plus probable que la bactérie s'installe dans les tissus, et tester le sang donnera des résultats négatifs.

TESTS DE DETECTION D'ANTIGENES

Les tests de détection d'antigènes recherchent une protéine unique dans un des fluides biologiques – (sang, urine, fluide synovial). Parfois, les patients dont les tests indirects sont négatifs obtiennent des résultats positifs avec ce test.

Le test Nanotrap® LA a récemment acquis une notoriété au niveau national

(USA) quand une subvention de 1 million de Dollars US lui a été accordée par la fondation Bill et Melinda Gates. Ce test utilise la technologie Nanotrap® pour mesurer directement les antigènes de Lyme dans l'urine en utilisant un format de Western Blot. Le test Nanotrap® est conçu pour procurer une haute sensibilité et exactitude, produisant des résultats certains aux stades précoces de l'infection. Le test Nanotrap® LA utilise une approche directe utilisant un antigène bactérien de Lyme, présent dans le corps et qui peut être détecté quelques jours après l'infection initiale. Inversement, le test Nanotrap® LA rendra un résultat négatif n'indiquant aucune présence d'antigène si l'infection a été éliminée avec un traitement efficace.

LES TESTS ENERGETIQUES

Il n'existe pas de test pour la maladie de Lyme qui puisse être considéré comme 'étalon-or' avec une fiabilité à 100%. C'est pour cela que les médecins spécialistes de la maladie de Lyme basent leur diagnostic de borrelia et ses co-infections sur les symptômes des patients, les tests en laboratoire, et des méthodes alternatives de dépistage non-conventionnelles, mais parfois plus sophistiquées, telles que le test énergétique.

Les instruments de dépistage électrodermal (tels que le ZYTO et l'ASYRA), par exemple, utilisent un logiciel et le réflexe cutané galvanique du corps pour détecter les déséquilibres énergétiques dans le corps. Ils peuvent aussi être utilisés pour détecter les fréquences énergétiques d'un large nombre de microbes pathogènes, et par conséquent, la présence de ces microbes. Un logiciel connecté à une manette ou un autre appareil scanne le corps pour des infections et autres déséquilibres et affiche ensuite un rapport sur les différents organismes pathogènes dont la présence est suspectée dans le corps, et leurs niveaux. De nombreux praticiens spécialistes de Lyme, tel que Lee Cowden, considèrent que le ZYTO est fiable à 90%. D'autres appareils peuvent être plus ou moins fiables.

La kinésiologie appliquée, ou le test de force musculaire, tel que le test de réaction automatique (TRA), qui a été développé par le spécialiste de la maladie de Lyme Dietrich Klinghardt, est une autre façon de tester le corps pour des infections en utilisant l'énergie du corps humain et le système nerveux autonome. La kinésiologie appliquée peut être un outil très utile pour établir le diagnostic.

Pour la TRA et d'autres méthodes courantes de tests musculaires, le praticien

applique une pression sur un des muscles du patient (d'habitude dans le bras), tout en appliquant une substance (dans ce cas une signature énergétique ou une substance physique d'un pathogène) contre le corps du patient. Il demandera au patient de résister. Le système nerveux autonome réagira à la substance ou au pathogène en créant une réaction du muscle du bras de la personne testée, soit faible, soit forte, indiquant ainsi au praticien la présence ou l'absence du pathogène dans le corps. Cependant, la fiabilité des résultats dépend largement de l'habileté et de l'expérience du praticien.

LES TESTS DE CO-INFECTIIONS

En matière de maladie de Lyme, les infections concomitantes sont très fréquentes. L'impact clinique et pathologique des co-infections a été reconnu pour la première fois dans les années 90 (Mitchell et al.1996). Leur synergie pathologique peut exacerber la maladie de Lyme et induire des manifestations cliniques similaires. Les agents co-infectieux peuvent être transmis en même temps que la *Borrelia burgdorferi* lors d'une morsure de tique, résultant ainsi en infections multiples, mais une partie infime de ces infections peut survenir indépendamment de la morsure. Les infections causées par ces pathogènes dans les patients non infectés par la maladie de Lyme peuvent déboucher sur des symptômes cliniques similaires à ceux de la maladie de Lyme. Ceci est le cas en particulier pour les infections causées par la *Bartonella henselae*, la *Yersinia enterocolitica* et le *Mycoplasme pneumoniae*. La *Chlamydia trachomatis* cause principalement la polyarthrite. La *Chlamydia pneumoniae* cause non seulement de l'arthrite mais elle affecte aussi le système nerveux et le cœur, ce qui rend les diagnostics différentiels difficiles. Le diagnostic est encore plus complexe quand les co-infections sont associées à la maladie de Lyme (Berghoff 2012).

En ce qui concerne les possibilités de tests, ceux-ci sont similaires aux tests pour la borréliose de Lyme. La PCR, l'ELISA et/ou les diagnostics par immunofluorescence sont disponibles pour la plupart de ces co-infections, mais ne couvrent pas toutes les espèces. D'autre part, elles doivent toutes être combinées à une présentation clinique.

- **La Babésia** : FISH (fluorescence in situ hybridisation - hybridation in situ en fluorescence, très spécifique et très sensible), frottis Giemsa, Immunofluorescence (IFA), sérologie, PCR.

- **La Bartonella** : pour la Bartonella, il y a uniquement une sérologie testant la *B. henselae* et *B. quintana* et il n'y a pas de Western Blot disponible. La Bartonella est très difficile à découvrir car il en existe de nombreuses espèces (plus de 30) et elles sont fréquemment organisées en biofilms (contenant des cellules et des substances polymériques extra cellulaires, créant ainsi une matrice qui fournit une barrière physique aux tests et traitements. Parmi les diagnostics, il y a aussi l'IFA (pas très fiable), la PCR (des sets multiples d'amorces sont nécessaires, mais en général ils échouent à cause des biofilms), des frottis de sang et rarement une culture + test PCR. En tant qu'option indirecte, le test ELISA quantifiant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est souvent utile dans la mesure où la Bartonellose est accompagnée d'une stimulation de formation de vaisseaux sanguins, induisant des granulomes dans certaines régions de la peau (Kempf et al. 2001). Les taux de VEGF augmenteront en présence d'une infection par la Bartonella mais seulement en l'absence d'infections par champignons. Si elles sont présentes, les lésions cutanées caractéristiques de la Bartonella (« scratch ») sont d'un grand intérêt pour établir le diagnostic.

- **Brucella** - Brucella CAPT, anticorps agglutinants, PCR.

- **Ehrlichia/Anaplasma** - ELISA, EliSpot, PCR, frottis Giemsa

- **Rickettsia** - PCR, sérologie, test IFA

- **Coxiella** - PCR, test IFA

- **Tularemia (Francisella tularensis)** - tests de détection d'antigènes, ELISA, PCR, culture, anticorps fluorescent direct

- **Leptospira** - Sérologie, immunochromatographie.

- **Leishmania** - sérologie

- **Mycoplasma** - sérologie (ELISA), PCR (sur sang, salive, tampon/prélèvement, culture bactérienne).

- **Chlamydiae** - Western Blot, ELISA, PCR, Elispot, antigènes dans les selles, frottis buccal, culture bactérienne.

- **Yersinia** - Western Blot (*Y. enterocolitica* et *Y. pseudopneumoniae*), EliSpot,

Tests d'antigènes dans les selles (*Y. enterocolitica* uniquement).

Il est à noter que les réponses immunitaires contre les antigènes de *Yersinia* peuvent jouer un rôle important dans la pathogénèse de l'arthrite chronique non-différenciée et de l'inflammation chronique (Van Der Heijden et al. 1997; Sacho & Lassen 1994).

- **Le virus d'Epstein-barr (EBV)** - Western Blot, PCR, EliSpot, sérologie, test antigène

- **Le virus de Coxackie** - PCR, test antigène, sérologie

- **Virus de l'herpes** - sérologie, PCR.

La liste des co-infectants possibles n'est pas exhaustive. De nouveaux pathogènes sont souvent mis en évidence, ainsi que des infections opportunistes. De plus, de nouveaux tests d'investigation sont en cours de développement et il est à espérer qu'ils complèteront et amélioreront les tests existants actuellement offerts.

APPROCHE INTEGRATIVE POUR LES INFECTIONS VECTORIELLES A TIQUES TARDIVES/PERSISTANTES/CHRONIQUES

Dans le but de mieux gérer les patients avec des infections tardives/chroniques et/ou persistantes qui sont très difficiles à découvrir, de plus en plus de spécialistes et certains laboratoires s'orientent vers une approche intégrative, incluant à la fois la détection directe de pathogènes et les tests de support indirects. Le taux élevé d'échec des tests relatifs aux IVT (infections vectorielles à tiques), particulièrement chez les patients en phase tardive/persistante/chronique, souligne la nécessité de prendre en compte les plaintes déclarées par les patients et considérer et investiguer pleinement les dérégulations potentielles résultant de ces IVT.

Les maladies vectorielles à tiques (MVT) chroniques peuvent imiter tous les procédés de maladies, y compris les syndromes de fatigue chronique (l'encéphalomyélite myalgique), la fibromyalgie, les conditions auto-immunes, y compris la polyarthrite rhumatoïde séronégative, les conditions psychiatriques incluant la dépression et l'anxiété, et des problèmes

significatifs de mémoire et de concentration qui imitent la démence précoce. C'est pour cela que la maladie de Lyme dans son sens général a été appelée "la grande imitatrice" par le Dr Richard Horowitz dans son livre 'Pourquoi ne vais-je pas mieux'?

Les IVT persistantes ont été signalées chez de nombreux patients autistes (Bransfield et al. 2008; Kuhn et al. 2012; Kuhn & Bransfield 2014). En effet, de nombreux spécialistes reportent leur attention sur les IVT pour évaluer les troubles du spectre de l'autisme.

Si un individu a des conditions de santé chroniques allant de l'arthrite au syndrome de fatigue chronique à la fibromyalgie, il est important d'éliminer ou de diagnostiquer la maladie de Lyme. Il est apparent que de nombreux cas de fibromyalgie et de syndrome de fatigue chronique sont en fait des maladies de Lyme déguisées (Nicolson & Nicolson 1998).

Les patients souffrant de Lyme chronique abritent souvent des "co-infections" telles que des Mycoplasmes, Chlamydias, Ehrlichia, Bartonella et Babésia. Ce sont différents types de pathogènes qui aiment la compagnie de *B. burgdorferi*.

Les patients atteints de Lyme et de MVT peuvent tout d'abord présenter des manifestations de problèmes gastro-intestinaux (GI). Ces patients peuvent avoir des problèmes GI complexes ou persistants impliquant les sections supérieure, médiane et inférieure du tractus intestinal. Le nombre de patients présentant ce genre de symptômes atteint maintenant des proportions épidémiques (Dr Rahbar, Conférence ILADS à Augsburg 2015). Les tests pour des problèmes gastro-intestinaux devraient être inclus.

Par conséquent, le **panel intégratif initial** se concentre sur :

- *La sérologie d'IgG et d'IgM de Borrelia par immunoblot.* Il s'agit d'un immunoassay (western blot, immunoblot) pour la détection des anticorps IgG et des IgM contre la *Borrelia burgdorferi* dans le sérum humain, le plasma ou le liquide céphalo-rachidien (LCR). Il détecte les anticorps contre quatre espèces immunopathogènes (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* et *B. bavariensis*). Pour être plus précis, il permet la détection de p100, VisE, p58, p41, p39, OspA (sans distinction d'espèces), l'OspC de toutes les espèces et le p18 de toutes les espèces. L'objectif de ce test n'est pas de distinguer les espèces mais d'offrir la couverture la plus large possible en matière de détection de maladie de Lyme.

- sérologie d'IgG et IgA/M de *Chlamydia* (immunoblot)

C'est un immunoblot pour la détection des anticorps IgG et IgA contre la *Chlamydia trachomatis*, la *Chlamydoghila pneumoniae* et la *Chlamydoghila psittaci*. Il est à noter que les tiques ne sont pas porteuses de la *Chlamydia* mais que la *Chlamydia* est réactivée lors d'une infection vectorielle à tique.

- sérologie d'IgG et d'IgM/IgA de *Yersinia* (immunoblot)

Un immunoblot pour la détection des anticorps IgG et IgM/IgA contre *Yersinia*. La différenciation sérologique des infections *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* est possible pour la première fois grâce à l'utilisation des antigènes spécifiques à l'espèce *Yersinia* (PsaA, MyfA).

- *Test FISH pour la Babesia* : Détection par Immunofluorescence in situ des infections de *Babesia*.

- *Test PCR d'infections par Mycoplasme*

Il a été découvert que les tiques sont porteuses de *Mycoplasmes*. Ces infections sont exacerbées, particulièrement chez les patients chroniques et tout spécialement chez les gens présentant des symptômes de maladies auto-immunes. *Mycoplasma* provoque la sur-stimulation des cellules B, promouvant les maladies auto-immunes et rhumatoïdes. Les mycoplasmes augmentent la production de IL-1 beta et IL-6.

- *Un test d'activité (TTL-MELISA ou ELISPOT)*

- *un comptage absolu de cellules CD57*

Les cellules CD57+/CD3- sont un sous-groupe des cellules NK. Le nombre absolu de cellules CD57+/CD3- est bas chez les patients souffrant de maladie de Lyme chronique. Les patients avec un nombre bas de CD57 ont un nombre significativement plus élevé de co-infections et de défauts immunologiques persistants que les patients avec un compte plus élevé.

- *Niveaux de PGE2 (Prostaglandine E2)*

Le PGE2 est un composé dérivé de phospholipides de membranes, et aussi un

médiateur clé des immunopathologies dans les infections chroniques et le cancer. Le PGE2 améliore sa propre production mais supprime les médiateurs d'inflammation aiguë, résultant en sa prédominance aux stades tardifs/chroniques de l'immunité. Le PGE2 supprime sélectivement les fonctions d'effecteur des macrophages et des neutrophiles et de l'immunité médiée par les cellules de type 1 Th1-, CTL-, et NK mais il favorise le Th2, le Th17, et les réactions des cellules régulatrices T. Le PGE2 est activé de façon significative chez les patients atteints d'infections vectorielles à tiques chroniques (Professor De Meirleir, Conférence ILADS à Anvers le 23.04.16).

- *IL-8*

Quand la *Borrelia* migre, elle donne lieu à une inflammation multisystémique. La chimiotaxie est effectuée par l'IL-1 et le TNF alpha. Cette migration induit une activation des cytokines, par exemple l'IL-8. Il est observé que l'IL-8 est activé de manière très significative dans les patients de MVT chroniques (Professeur De Meirleir, Conférence ILADS à Anvers 23.04.16).

- *sCD14*

Le CD14 est exprimé par les monocytes/macrophages et joue un rôle critique dans la reconnaissance des composants (lipopolysaccharides, LPS) de parois bactériennes. La partie extracellulaire du CD14 peut être clivée et relâchée dans la circulation, où elle inactivera les LPS circulants. Les niveaux de sérum soluble CD14 (sCD14) sont significativement élevés chez les patients avec une maladie inflammatoire des intestins et la maladie de Crohn, mais aussi les patients souffrant d'une Brucellose ou de la maladie de Lyme. Les patients en début de maladie de Lyme ou non traités avaient des taux de sCD14 significativement plus élevés que ceux des patients sains du groupe contrôle.

- *VEGF*

Le VEGF joue un rôle significatif dans les conditions pathologiques associées aux maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (LES), l'arthrite rhumatoïde (AR), la sclérose en plaques (SEP). Des niveaux anormalement élevés de VEGF dans un environnement sans moisissures suggèreraient une infection de *Bartonella* (Kempf et al. 2001)

- *CD38*

Le CD38, qui a un rôle important dans la chimiotaxie des cellules dendritiques (CD) et la migration vers les ganglions lymphatiques, était fortement activé par le LPS mais pratiquement pas du tout par les *Borrelia garinii* (qui induisent principalement la neuroborréliose). Ces conclusions ont été confirmées par une RT-PCR quantitative avec cytométrie en flux au niveau des protéines. De plus, La RT-PCR a montré que l'expression des CCR7 (dont il est prouvé qu'il stimule la maturation des cellules dendritiques) était 11 fois plus importante dans les cellules stimulées par le LPS que dans celles stimulées par la *Borrelia garinii*. Ces résultats suggèrent que la *Borrelia garinii* pourrait affecter les fonctions cruciales des cellules dendritiques en bloquant l'activation d'importantes molécules au cours de la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques, affectant ainsi davantage les réactions immunitaires dans les infections par Borrélioses de Lyme. (Hartiala et al. 2007). D'autre part, afin de déterminer si l'incapacité de *B. garinii* à induire l'expression du CD38 pourrait être attribuée à d'autres espèces de *B. burgdorferi*, Hartiala et ses collègues (J Immunol. 2010) ont stimulé des CD avec des *B. burgdorferi sensu stricto* et des *B. afzelii*. Aucune de ces espèces de borrelies n'a induit une activation de CD38.

- Test pour les problèmes gastro-intestinaux

1. test de selles MSA

Les chercheurs de R.E.D. Laboratories ont développé et validé une nouvelle procédure pour analyser les populations bactériennes dans un échantillon de matières fécales : le test MSA est une nouvelle technique moléculaire impliquant le séquençage de régions spécifiques d'ADN bactérien (Métagénomiques). Jusqu'à récemment, la recherche portant sur la composition du microbiome reposait presque exclusivement sur la culture, alors que (i) 40 à 80% des bactéries intestinales ne peuvent pas être cultivées, (ii) l'identification des colonies peut être difficile, (iii) les bactéries doivent être vivantes : les études des anaérobies sont très difficiles, il y a de lourdes pertes pendant la collecte et le traitement des échantillons, (iv) l'approche de la culture pourrait n'adresser qu'une petite fraction de toutes les espèces bactériennes (10%?). Par contre, l'identification de chaque bactérie en comparant les séquences aux bases de données publiques est extrêmement précise, non-subjective, et une technologie à haut débit permet l'identification de dizaines ou même de centaines d'organismes dans un seul échantillon.

2. La Calprotectine dans les selles

La Calprotectine est une protéine cytosolique de neutrophiles avec des propriétés antimicrobiennes, présente à des concentrations accrues dans les selles au cours des inflammations intestinales.

3. le D-lactate dans le sérum

Le D-lactate est un produit de métabolisme bactérien, et n'est ni produit, ni métabolisé par les cellules de mammifères. Typiquement, des niveaux élevés de D-lactate sont dûs à des infections bactériennes ou au syndrome d'intestin court (*short bowel syndrome*) chez les humains. Dû à un métabolisme ou une excrétion lente, le taux de D-lactate peut causer des acidoses et des encéphalopathies.

Etant donné que des infections persistantes favorisent des dégâts importants dans le corps, qui ont besoin d'être réparés, les tests suivants pourraient être considérés dans une **approche intégrative plus large** se focalisant non seulement sur l'identification des causes de l'infection mais aussi sur ses dégâts globaux :

- Test pour la Tularémie (recherche des anticorps contre *Francisella tularensis*)
- Test pour la Brucellose (le test BrucellaCapt est très sensible et spécifique)
- Test pour Coxiella, Anaplasma, Rickettsia, Bartonella (PCR et/ou sérologie)
- Test pour Epstein-barr virus (EBV) (de préférence par immunoblot et PCR)
- Test pour les infections par le virus de l'herpès (HHV6) et son intégration chromosomale potentielle
- Test pour les infections par CHAMPIGNONS (en particulier le Candida)
- Test pour l'inflammation (les niveaux de cytokines (voir Grab et al. 2007) et le stress oxydatif) : l'inflammation crée des radicaux libres et le stress oxydatif qui endommage les parois des membranes, la mitochondrie, et les cellules nerveuses, créant le "syndrome de maladie"; (fatigue, douleurs, dysfonction

cognitive, troubles de l'humeur)

-Test de compléments (C3a et C4a) : C4a apparaît comme marqueur immunologique de valeur chez les patients avec des symptômes persistants de maladie de Lyme (Stricker et al. 2009)

- Test pour l'intoxication par les métaux lourds et les carences nutritionnelles (minéraux, vitamines, etc).

- Test pour les métabolites toxiques (ammoniaque, acides kynurénique et quinolinique).

- test d'anticorps pour les maladies de tissus conjonctifs (immunoblots ANA/ENA).

- Test pour l'intestin perméable (Zonuline dans les selles, anticorps contre les bactéries intestinales dans le sérum)

Les IgA/IgM contre les bactéries intestinales : un test de dépistage d'anticorps (IgA et IgM) dirigés contre les antigènes de pathogènes intestinaux. Les IgA sont sécrétés par les cellules intestinales, les IgM sont produits par les cellules immunitaires dans le sang. Chez les individus sains, les bactéries pathogènes ne se trouvent qu'en faibles quantités dans l'intestin, et les titres d'anticorps sont très bas. Cependant, dans le cas d'une croissance importante de bactéries (dysbiose), de larges quantités d'IgA sont produites et seront trouvées dans le sang. En cas de colon perméable, les protéines bactériennes peuvent être acheminées vers le flux sanguin, et les IgM spécifiques seront produites. Par conséquent, un titre élevé d'IgM contre les bactéries intestinales est un indicateur de perméabilité intestinale accrue.

Le test ZONULIN ELISA dans les selles : La Zonuline module la perméabilité des jonctions serrées entre les cellules des parois du tractus digestif. Comme le niveau de Zonuline augmente, le joint entre les cellules intestinales diminue, ouvrant des espaces entre les cellules qui permettent à de nombreuses macromolécules de traverser la paroi. C'est ce qu'on appelle "l'intestin perméable".

- Test pour l'inflammation intestinale (sIgA, EDN/EPX, beta-defensin-2)

Test ELISA sIgA dans les échantillons de selles : la fonction clé du sIgA est

de se lier à des microorganismes et des toxines envahissants et de les piéger dans une couche de mucus ou à l'intérieur des cellules épithéliales, inhibant ainsi la mobilité microbienne, agglutinant les organismes et neutralisant leurs exotoxines, et facilitant ensuite leur élimination du corps dans les excréments. La concentration de sIgA nous donne des informations à propos de la défense immunitaire intestinale : un manque de sIgA indique une activité diminuée du système immunitaire intestinal, et un niveau accru de sIgA démontre l'inflammation intestinale.

Le test ELISA EPX/EDN : L'accumulation de l'EDN dans les intestins est associée à une inflammation et des tissus endommagés. Mesurer l'EDN dans les selles peut servir en tant que paramètre objectif pour une inflammation clinique actuelle ou une inflammation chronique sous-clinique localisée dans la région gastro-intestinale. L'EDN fécal est considéré la meilleure des protéines de granules cytotoxiques pour évaluer l'inflammation intestinale, car il reflète très précisément les scores cliniques, endoscopiques, et histologiques d'activité pathologique et les dégâts dans les muqueuses. Des niveaux élevés d'EDN fécal sont liés à de multiples conditions inflammatoires, telles que des allergies/sensibilités à certains aliments, des infections pathogènes (*C. difficile* et *H. pylori*), le syndrome du côlon irritable (SCI) et les désordres gastro-intestinaux à éosinophiles.

Le test ELISA β -defensin : Les β -defensins sont une part intégrale du système immunitaire congénital et contribuent par leur effet anti-microbien à la fonction de barrière des cellules épithéliales de l'intestin. Les defensins exercent une activité antimicrobienne de degré variable contre les bactéries, les champignons, et certains virus enveloppés. L'expression des β -defensins est induite par les cytokines pro-inflammatoires ainsi que par l'intermédiaire de microorganismes (p.ex *E. coli*, *H. pylori* ou *P. aeruginosa*) et par des micro-organismes probiotiques. Une carence en β -defensin peut, par exemple, être observée dans le mucus intestinal des patients atteints de la maladie de Crohn. Le système de défense des membranes muqueuses est par conséquent restreint et permet une invasion bactérienne accrue, qui pourrait mener à une infection typique chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Des résultats récents tendent à démontrer que la β -defensin est sur-exprimée dans les inflammations intestinales actives, particulièrement dans les colites ulcéraives.

POSSIBILITES FUTURES POUR LES TESTS DE DIAGNOSTIC

Etant donné que les traitements sont plus efficaces aux stades précoces de la maladie de Lyme, il y a grand besoin de développer des diagnostics simples, rapides, et sûrs pour déterminer si les patients ont été infectés. D'après le National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), "les chercheurs soutenus par le NIAID ont identifié des séquences de génomes de nombreuses espèces de *B. burgdorferi*. Les avancées technologiques telles que les micro-réseaux, l'imagerie et la protéomique laissent espérer des outils diagnostiques améliorés permettant de fournir de nouvelles informations sur la pathogénèse de la maladie de Lyme. Des exemples d'outils futurs développés avec le soutien de NIAID incluent l'utilisation de métabolites pour caractériser de nouveaux bio-marqueurs d'infection, les mesures de cellules-T nouvelle génération, et de nouveaux antigènes pour l'amélioration des évaluations de traitements efficaces".

TickPlex, une nouvelle méthode basée sur la nanotechnologie et mise au point par un groupe finlandais, est en ce moment en cours d'élaboration en tant qu'outil de diagnostic d'infections multiples.

Parmi les récents développements, presque prêts à être inclus dans les panels de tests, on trouve la technique d'Hybrispot (de chez Master Diagnostica) avec leur 'TICK-BORNE BACTERIA FLOW CHIP' qui permet la détection simultanée (par PCR et blot) de 7 genres de bactéries vectorielles à tiques : Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Francisella, Bartonella, Borrelia et Coxiella. Cette technique est compatible avec les échantillons humains, animaux et de tiques. Alors qu'elle est extrêmement prometteuse, la technique n'offre toujours pas de bonne reproductibilité, et montre des différences d'un lot à l'autre.

Enfin, avec l'attention accrue accordée à l'heure actuelle aux MVT, les tests existants (tels la PCR) sont constamment améliorés et aboutissent à de meilleurs résultats.

Partager et répandre les connaissances est le premier pas vers de meilleurs tests.

REMARQUES FINALES

Faire la synthèse des tests relatifs aux maladies vectorielles à tiques est une tâche énorme. A l'heure actuelle, de nombreux articles, livres, sites web, blogs, etc. sont disponibles (voir la petite sélection ci-dessous), et de nombreuses conférences se tiennent chaque année. L'objectif de cette contribution est de

présenter une partie de cette information et d'en faire une ressource pratique pour les patients de façon à promouvoir la compréhension de l'utilité mais aussi des limites des tests disponibles, ainsi que des raisons pour lesquelles ils échouent ou ne sont pas toujours fiables. Le but final est également de souligner le besoin d'une approche intégrative globale pour une meilleure gestion des MVT.

Résumée écrit par Tanja Mijatovic, PhD (R.E.D. Laboratories CSO & Lab Manager), traduit de l'anglais par Mme Cécile Limon

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET LES SOURCES:

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev. 18(3) :484-509, 2005.

Asch ES, Bujak DI, Weiss M, Peterson MG, Weinstein A.. Lyme Disease: an infectious and postinfectious syndrome. J Rheum 21:454-61, 1994.

Bakken LL, Case KL, Callister SM, et al. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme Disease serology. JAMA 268:891-5, 1992.

Berghoff W. Chronic Lyme Disease and Co-infections: Differential Diagnosis. Open Neurol J. 6:158-78, 2012.

Berghoff W. Open Neurol J. 6:158-78, 2012.

Branda JA, Rosenberg, E.S. Borrelia miyamotoi: A lesson in disease discovery. Ann Intern Med 159: 61-2, 2013.

Bransfield RC, Wulfman JS, Harvey WT, Usman AI. The association between tick-borne infections, Lyme borreliosis and autism spectrum disorders. Med Hypotheses. 70(5):967-74, 2008.

Donta ST. Lyme Disease: A clinical challenge. J Spirochet and Tick Dis 2:50-51, 1995.

Donta ST. Late and chronic Lyme disease. Med Clin North Am. 86(2):341-9, 2002.

Embers ME, Barthold SW, Borda JT, Bowers L, Doyle L, Hodzic E, Jacobs MB, Hasenkampf NR, Martin DS, Narasimhan S, Phillippi-Falkenstein KM, Purcell JE, Ratterree MS, Philipp MT. Persistence of Borrelia burgdorferi in rhesus macaques following antibiotic treatment of disseminated infection. PLoS One. 2012;7(1):e29914.

doi: 10.1371/journal.pone.0029914. Erratum in: PLoS One. 2013;8(9). doi:10.1371/annotation/f84663e3-0a2c-4243-8f97-3a58133c1b0f. PLoS One. 2012;7(4):10.1371/annotation/4cafed66-fb84-4589-a001-131d9c50aea6.

Forsberg P, Ernerudh J, Ekerfelt C, Roberg M, Vrethem M, Bergström S. The outer surface proteins of Lyme disease borrelia spirochetes stimulate T cells to secrete interferon-gamma (IFN-gamma): diagnostic and pathogenic implications. *Clin Exp Immunol.* 101(3):453-60, 1995.

Grab DJ, Nyarko E, Barat NC, Nikolskaia OV, Dumler JS. Anaplasma phagocytophilum-Borrelia burgdorferi co-infection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brainmicrovascular endothelial cells. *Clin Vaccine Immunol.* 14(11):1420–4, 2007.

Hartiala P, Hytönen J, Pelkonen J, Kimppa K, West A, Penttinen MA, Suhonen J, Lahesmaa R, Viljanen MK. Transcriptional response of human dendritic cells to Borrelia garinii--defective CD38 and CCR7 expression detected. *J Leukoc Biol.* 82(1):33-43, 2007.

Hartiala P, Hytönen J, Yrjänäinen H, Honkinen M, Terho P, Söderström M, Penttinen MA, Viljanen MK. TLR2 utilization of Borrelia does not induce p38- and IFN-beta autocrine loop-dependent expression of CD38, resulting in poor migration and weak IL-12 secretion of dendritic cells. *J Immunol.* 184(10):5732-42, 2010.

Horowitz Richard, book : Why Can't I Get Better? Solving the Mystery of Lyme and Chronic Disease. St Martin's Press US, 2013.

Horowitz Richard, book : How Can I Get Better? An Action Plan for Treating Resistant Lyme and Chronic Disease. St Martin's Press US, 2016.

Jin C, Roen DR, Lehmann PV, Kellermann GH. An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to Borrelia burgdorferi. *Cells.* 2(3):607-20, 2013.

Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T, Autenrieth IB. Evidence of a leading role for VEGF in Bartonella henselae-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol.* 3(9):623–32, 2001.

Kugeler KJ, Farley GM, Forrester JD, Mead PS. Geographic Distribution and Expansion of Human Lyme Disease, United States. *Emerg Infect Dis.* 21(8):1455-7, 2015.

Kuhn M, Bransfield R2. Divergent opinions of proper Lyme disease diagnosis and implications for children co-morbid with autism spectrum disorder. *Med Hypotheses.* 83(3):321-5, 2014.

Kuhn M, Grave S, Bransfield R, Harris S. Long term antibiotic therapy may be an effective treatment for children co-morbid with Lyme disease and autism spectrum disorder. *Med Hypotheses*. May 78(5):606-15, 2012.

Lee SH, Vigliotti JS, Vigliotti VS, Jones W, Shearer DM. Detection of *Borreliae* in archived sera from patients with clinically suspect Lyme disease. *Int J Mol Sci* 15: 4284-98, 2014.

Lin B, Noring R, Steere AC, Klempner MS, Hu LT. Soluble CD14 levels in the serum, synovial fluid, and cerebrospinal fluid of patients with various stages of Lyme disease. *J Infect Dis*. 181(3):1185-8, 2000.

Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of co-infection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol*. 34(3):724-7, 1996.

Nicolson GL, and Nicolson NL. Chronic infections as a common etiology for many patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and Gulf War Illness. *Intern J Med* 1:42-6, 1998.

Nordberg M, Forsberg P, Nyman D, Skogman BH, Nyberg C, Ernerudh J, Eliasson I, Ekerfelt C. Can ELISPOT Be Applied to A Clinical Setting as A Diagnostic Utility for Neuroborreliosis? *Cells*. 1(2):153-67, 2012

Pachner AR, Delaney E, O'Neill T, Major E. Inoculation of nonhuman primates with the N40 strain of *Borrelia burgdorferi* leads to a model of Lyme neuroborreliosis faithful to the human disease. *Neurology* 45:165-72, 1995.

Puri B, Segal D, Monro J. Diagnostic use of the lymphocyte transformation test-memory lymphocyte immunostimulation assay in confirming active Lyme borreliosis in clinically and serologically ambiguous cases. *Int J Clin Exp Med* 7(12):5890-5892, 2014.

Saebo A, Lassen J. *Yersinia enterocolitica*: an inducer of chronic inflammation. *Int J Tissue React*. 16(2):51-7, 1994.

Seltzer EG, Gerber MA, Carter ML, Freudigman K, Shapiro ED. Long-term outcomes of persons with Lyme disease. *JAMA* 283:609-616, 2000.

Shadick NA, Phillips CB, Logigian EL, Steere AC, Kaplan RF, Berardi VP, Duray PH, Larson MG, Wright EA, Ginsburg KS, Katz JN, Liang MH. The long-term clinical outcomes of Lyme Disease. *Ann Intern Med* 121:560-7, 1994.

Siniscalco D, Mijatovic T, Bosmans E, Cirillo A, Kruzliak P, Lombardi VC, De Meirleir K, Antonucci N. Decreased Numbers of CD57+CD3- Cells Identify Potential Innate

Immune Differences in Patients with Autism Spectrum Disorder. *In Vivo*. 30(2):83-9, 2016.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest*. 113(8):1093-1101, 2004.

Steere AC. Lyme Disease. *NEJM* 345:115-25, 2001.

Stricker RB, Burrascano J, Winger E. Long term decrease in the CD57 lymphocyte subset in a patient with chronic Lyme disease. *Ann Agric Environ Med*. 9 :111-3, 2002.

Stricker RB, Johnson L. Lyme disease diagnosis and treatment: lessons from the AIDS epidemic. *Minerva Med*. 101(6):419-25, 2010.

Stricker RB, Savely VR, Motanya NC, Giclas PC. Complement split products c3a and c4a in chronic lyme disease. *Scand J Immunol*. 69(1):64-9, 2009.

Stricker RB, Winger EE. Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. *Immunol Lett*. 76(1):43-8, 2001.

Sykes R. An Estimate of Lyme Borreliosis Incidence in Western Europe. *Res Medica* 22(1): 76-87, 2014.

Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am*. 22(2):217-34, 2008.

Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp M. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA) for Lyme borreliosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 57(1):27-34, 2007.

van der Heijden IM, Res PC, Wilbrink B, Leow A, Breedveld FC, Heesemann J, Tak PP. *Yersinia enterocolitica*: a cause of chronic polyarthritis. *Clin Infect Dis*. 25(4):831-7, 1997.

Wormser G, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DT, Shapiro ED, Steere AC, Rush TJ, Rahn DW, Coyle PK, Persing DH, Fish D, Luft BJ. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clin Infect Dis* 31(S1):S1-S14, 2000.

SITES INTERNET :

<http://whatislyme.com/tom-grier-microbiologist/>

www.redlabs.com/

<http://www.ceresnano.com/>

www.prohealth.com

www.ilads.org

<https://www.arminlabs.com/>

www.igenex.com/

www.bca-lab.de/

<http://labo-barla.eu/>
<http://www.klinghardtacademy.com/>
www.melisa.org/
<http://tickplex.com/>
<http://norvect.no/>
www.tiredoflyme.com
www.columbia-lyme.org
www.lymediseasechallenge.org
www.lymeneteurope.org
www.ticktalkireland.org
www.tekentiques.net
www.lymeresearchalliance.org
www.emedicine.medscape.com
www.lymediseaseaction.org.uk
www.lymedisease.org
www.labtestsonline.org
<https://canlyme.com>
www.francelyme.fr

CONFERENCES:

ILADS Augsburg 25-26/4/ 2014

ILADS Augsburg 8-9/5/2015

ILADS Helsinki 11-12/6/2016

2nd Lyme-Disease Update, Klagenfurt 25/4/2015

BBOW-APSO Lyme Conference, Antwerp 12-13/9/2015

France Lyme Conference, Paris 14/11/2015

ILADS one-day workshop Antwerp 23/4/ 2016

The Tick Factor, Amsterdam 17-18/9/2016