

## **2. METHODES DIAGNOSTIQUES DIRECTES :**

### **2.1. POLYMERASE CHAIN REACTION ou AMPLIFICATION GENIQUE :**

#### **2.1.1. Principe de la PCR:**

La PCR met en évidence la présence de Borrélie in vitro en recherchant leur ADN spécifique. Elle consiste à amplifier un million de fois cet ADN selon le principe de duplication.

Le matériau pour cette recherche peut provenir de différents liquides corporels, ponction articulaire, LCR, urine, sang, ou d'un tissu infecté comme une biopsie cutanée d'un EM (érythème migrant), d'une peau modifiée par l'ACA (Acrodermatite Chronique Atrophiante), ou de vésicules ou de muqueuses du nez- ORL, ainsi que d'échantillon de muscles ou de tendons.

Il s'agit d'une répllication in vitro de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer des millions de copies d'un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt), à partir d'un extrait d'ADN. En effet, si la séquence d'intérêt est présente dans l'extrait d'ADN, il est possible de sélectivement la répliquer- on parle d'amplification - en très grande quantité.

#### **2.1.2. Rappel :**

« La molécule d'ADN doit sa pérennité et la transmission de l'information qu'elle contient au fil des divisions cellulaires à un mécanisme hautement complexe et très reproductible qu'est la répllication (ou duplication). Ce phénomène universel est très spécifique à la fois chez les organismes eucaryotes et procaryotes. Il assure une fidèle duplication du support de l'information génétique qu'est la molécule d'ADN.

Le mécanisme de répllication est effectué selon un principe semi-conservatif qui assure une fidèle duplication de l'information génétique. Cette duplication semi-conservatrice repose sur le fait que chaque brin d'ADN sert de matrice

pour la synthèse de chaque nouveau fragment et permet de conserver les séquences d'origine. Ce principe aboutit à deux molécules d'ADN identiques à la molécule initiale.

La synthèse d'un brin d'ADN s'effectue par l'enchaînement de désoxyribonucléotides (dNTP) eux-mêmes composé de 3 parties :

- une base nucléique Adénine A/ Guanine G/ Thymine T/ Cytosine C
- un résidu désoxyribose
- un groupe phosphate,

Une enzyme «ADN polymérase» catalyse la formation de liaisons tout en respectant la règle de complémentarité des bases A-T ; G-C. »

La mise en évidence de la présence de Borrélioses in vitro fait par la recherche de leur ADN spécifique en amplifiant un million de fois cet ADN selon le principe de duplication.

### **2.1.3. Limite du test :**

L'absence de réponse ne permet pas d'exclure une borreliose, les borrelies pouvant être absentes du prélèvement, présentes dans un 2ème prélèvement.

-La méthode de diagnostic par PCR ne peut néanmoins pas définir si les Borrélioses sont vivantes ou déjà mortes, car par un processus de décomposition, les Borrélioses ainsi que leur ADN sont évacués des tissus ou des fluides corporels dans un laps de temps d'environ 4 semaines.

### **2.1.4. Conclusion :**

La recherche positive permet d'affirmer la présence de Borrélioses du fait de la grande spécificité de la technique.

-Lorsqu'un examen par PCR révèle une positivité de l'ADN des borrelies, on peut en déduire que l'infection est très récente, voire actuelle et active.

## **2. 2. SEQUENCAGE A HAUT DEBIT (SHD):**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

### **2.2.1. Principe :**

C'est une méthode par synthèse enzymatique qui consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit nucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase dépourvue d'activité d'exonucléase en présence d'un mélange des 4 désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et une faible concentration de 4 didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) chacun associé à un marqueur fluorescent différent. Une fois incorporé dans le nouveau brin synthétisé, ces didésoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les positions dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur gel de polyacrylamide, ce qui permet ainsi de lire la suite de chacune des bases dans la séquence. Une dernière étape de traitement bioinformatique permet alors la reconstitution d'un génome entier à partir de tous les fragments séquencés.

La dernière génération des séquenceurs à capillaires permet aujourd'hui de lire jusqu'à 2 millions de bases en une demi-journée. Les séquenceurs de « nouvelle génération » ont permis de s'affranchir d'un certain nombre de biais de la méthode initiale. C'est grâce notamment à la lecture de plusieurs millions de séquences en parallèle que ces nouveaux séquenceurs à haut débit ont révolutionné les analyses en génomique.

Le fonctionnement se fait en 3 étapes :

- Préparation et amplification des molécules d'ADN à analyser,
- Incorporation des bases complémentaires du brin à séquencer,
- Lecture de la séquence proprement dite.

### **2.2.2. Limite du test :**

Cependant face à cette escalade technologique il faut garder à l'esprit que le séquençage à haut débit doit faire face encore à plusieurs limitations. On manque de recul sur les capacités de ces outils à quantifier précisément les événements biologiques complexes.

Le séquençage haut débit produit des quantités très importantes de données dont la gestion n'est pas totalement maîtrisée.

### **2.2.3. Conclusion :**

Avec les coûts en baisse et un champ d'application très étendu, ces méthodes vont dans les années à venir complètement modifier la façon dont les scientifiques envisagent les études en génomique. En outre, la mise à disposition par les fabricants, d'appareils abordables et automatisés, va rendre ces méthodes incontournables.

## **2. 3. OBSERVATION MICROSCOPIQUE :**

C'est une méthode de preuve directe de la présence des Borrélios, utilisée actuellement en Afrique équatoriale par l'Institut Pasteur, et en Allemagne.

Ce moyen diagnostique est le «*gold standard*» d'après les Pr Léon Le Minor et Michel Veron de l'Institut Pasteur, dans «*Bactériologie Médicale* » paru chez Flammarion en 1989.

### **2.3.1. Principe :**

« Le diagnostic repose sur la mise en évidence du parasite dans les humeurs du malade ou chez le vecteur, par microscopie en contraste de phase, en fond noir ou après coloration, en lumière ordinaire ou en fluorescence. Si le taux de parasitémie est bas, on peut concentrer les germes par centrifugation ou utiliser le procédé de la goutte épaisse. »

Une observation microscopique sur fond noir, ou en lumière ordinaire, se fait sur sang frais sans fixateur ni colorant. On prélève une petite goutte de sang provenant de capillaires du bout du doigt soigneusement désinfecté en utilisant une lancette sécurisée (BD Microtainer). On dépose la goutte sur une lame en verre stérile et on recouvre avec une lamelle. Pour faire éclater les globules rouges dans lesquels se réfugient les borrelies, on appuie fortement sur la lamelle avec le doigt. On peut aussi introduire le prélèvement sanguin dans un tube stérile EDTA, que l'on peut acheminer par la poste, car même après 3-4 jours, la fluidité du sang est préservée dans le tube et permet de retrouver les Borrélios intactes.

### **2.3.2. Interprétation :**

Une infection borélienne récente permet d'observer les bactéries encore actives, se déplaçant dans le plasma en ondulant, ou en se tortillant vivement autour de leur axe de manière caractéristique, ou en présentant des tremblements le long du corps bactérien. Elles sont ainsi facilement détectables. On peut observer l'échantillon de sang au microscope durant plusieurs jours, car des modifications sont à attendre, du fait des formidables capacités des Borréliés à s'adapter et à se transformer.

Dans le cadre d'une infection chronique, elles ne sont pas toujours décelables dans le plasma sanguin immédiatement. Mais après plusieurs heures ou plusieurs jours d'observation, on peut les voir se «faufiler» hors des érythrocytes, souvent en restant accrochés au bord du globule rouge avec des mouvements d'ondulations caractéristiques.

On observe des formes de dégénérescence, quand se développent tout au long du corps bactérien des granules, des vésicules, ou quand le spirochète se transforme en sphérule. La taille du spirochète peut aller de 30 $\mu$  - 40 $\mu$  jusqu'à une taille 100 fois plus petite ! Leur très petite taille pose alors un problème d'identification des borréliés qui apparaissent semblables à des particules mues par un mouvement brownien.

### **2.3.3. Limite de l'observation microscopique:**

« On doit parcourir soigneusement les lames et répéter les examens car, si la présence du germe est un critère suffisant, son absence n'infirmes pas le diagnostic. Les examens sont positifs dans 80% des borrélioses à poux et dans moins de 50% des cas de borrélioses à tiques. » (Bactériologie Médicale 1989)

Les formes de dégénérescence peuvent prêter à confusion, et l'observation doit être minutieuse.

Par ailleurs, les Borréliés se retrouvent le plus souvent déjà quelques heures après l'infection dans les cellules de divers tissus du corps, tout comme dans les cellules endothéliales et sanguines.

### **2.3.4. Conclusion :**

Dans la littérature spécialisée en microbiologie («Bactériologie Médicale») il est fait état de recours aux investigations par microscopie sur fond noir ou en lumière ordinaire, comme preuve absolue concernant les spirochètes, ainsi que cela a été pratiqué dans la recherche (sur prélèvements cutanés frais) du spirochète de la syphilis. La méthode de recherche de parasite dans le sang périphérique est systématiquement pratiquée pour le diagnostic du Paludisme, là où se concentrent les éléments, alors pourquoi pas pour le diagnostic de la borréliose ?

Cette technique d'observation microscopique des Borrélioses est hors nomenclature, et n'est donc pas utilisée comme méthode de preuve directe dans les laboratoires d'analyses médicales.

### **3. APPRECIATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE :**

#### **3.1. SURVEILLANCE DES CELLULES NK TYPE CD-57 :**

La capacité à mesurer les « Cellules Natural Killer » que sont les cellules type CD-57 représente une percée dans le traitement de la maladie de Lyme chronique.

##### **3.1.1. Principe :**

Les infections chroniques de Lyme sont connues pour inhiber le système immunitaire. Le spirochète de Lyme peut affecter tous les principaux types de cellules du système immunitaire, avec un impact particulier sur un sous-ensemble de cellules tueuses naturelles. C'est ce qu'on appelle le sous-ensemble CD-57.

Par comparaison, dans l'infection à VIH, le nombre de lymphocytes T est anormalement bas, et utilisés comme marqueurs d'une infection active.

Dans la borréliose de Lyme, nous pouvons utiliser le CD-57 pour indiquer le degré d'activité de l'infection. Leur baisse permet d'évaluer la baisse du système immunitaire, qui caractérise la maladie «de Lyme ».

Dans le Lyme chronique, ou lorsque la maladie est active depuis plus d'un an, le CD-57 est abaissé voire nul.

Ce test peut être utilisé au début du traitement, puis tous les 3-4 mois afin de documenter l'efficacité du traitement. On espère voir un nombre stable ou une tendance à la hausse au fil du temps.

- Lorsque le traitement antibiotique est arrivé à son terme, si le CD-57 n'est pas supérieur à 60, une rechute de Lyme est susceptible de se produire.

- Si les NK CD-57 grimpent à nouveau après le traitement, cela peut être la preuve du succès de la thérapie.

### **3.1.2. Interprétation :**

La valeur de la mesure du CD-57 reflète le degré d'infection.

(Test réalisé par LabCorp / labo Chapy).

-Valeur supérieure à 200 : normal.

-Valeur supérieure à 60 : bon pronostic pour l'évolution après traitement.

-Valeur inférieure à 20 : maladies graves.

### **3.1.3. Limite du test :**

Ce n'est pas un test de diagnostic, mais il s'utilise comme un marqueur de Lyme actif.

L'incidence d'autres infections que le spirochète de Borréliose montre également un abaissement du CD-57.

### **3.1.4. Conclusion :**

Ce test peut être utilisé pour aider à déterminer la façon dont l'infection est active, la façon dont le traitement est efficace, et si, après la fin du traitement, une rechute est susceptible de se produire.

## **3.2. TEST DE TRANSFORMATION DES LYMPHOCYTES «TTL» :**

Avec le TTL la réponse cellulaire (et non humorale) du patient est mesurée par rapport à des Ag borréliens, ce qui, d'après toutes les études conduites jusqu'alors, semblerait plus sensible que la formation des Ac humoraux.

Cette réponse cellulaire immunologique des cellules T mémoires est la première réponse positive immunologique et ceci au bout de 5 à 10 jours (!) après l'infection à Borrélias, ce qui signifie longtemps avant la formation humorale des IgM et IgG qui le plus souvent ne sont décelables qu'après 4-6 semaines et non avant.

### **3.2.1. Principe :**

On observe la prolifération ou l'activation des lymphocytes du malade en présence d'un lysat de Borrélias quand la borréliose est active.

Permet d'en déduire :

- 1) une infection en cours
- 2) un traitement efficace
- 3) une récurrence.

Le LTT reste positif aussi longtemps que subsiste un contact entre les Borrélias et le système immunitaire. Le LTT est le seul paramètre de tous les tests indirects prouvant la présence et l'activité de l'agent infectieux.

### **3.2.2. Limite du test:**

La réaction positive obtenue n'est cependant pas la preuve absolue de la présence de Borrelia.

### **3.2.3. Conclusion :**

Ce test « accroche » avec une très haute sensibilité, chez les patients infectés par Borrelia.

## **REMARQUE :**



Le diagnostic d'une borréliose peut être complété par la recherche des co-infections transmises par les tiques : Rickettsia, Anaplasma/Ehrlichia, Bartonella, Babesia, Chlamydia pneumoniae/trachomatis, Mycoplasmes, Toxoplasmes, Yersinia, EBV, CMV, HSV, Coxsackie, HHV, Candida.

Ces co-infections sont mises en évidence par des sérodiagnostics type ELISA ou SIA, ou par des réactions cellulaires type TTL.

### **CONCLUSIONS :**

Toutes les méthodes d'investigation pour la recherche d'une infection à Borrelia ont fait l'objet de parutions scientifiques internationales (référence à l'ILADS : International Lyme and Associated Diseases Society).

Or, seules les techniques ELISA, dont la fiabilité est contestée par l'ILADS et par le rapport du HCSP, ont été « recommandées » par l'IDSA, la SPILF, le CNR des Borrelia, imposées à la nomenclature par la Caisse Primaire d'Assurance Maladie, pour établir un diagnostic de dépistage de la borréliose de Lyme.

La SPILF reconnaît pourtant qu'il faut : « établir un diagnostic fiable pour proposer un traitement adapté » et que « les moyens dont nous disposons ne sont pas tous parfaits ».

Alors pourquoi, à l'heure actuelle, malgré la remise en question de la technique de dépistage dans le rapport officiel du HCSP (décembre 2014), les médecins sont-ils obligés de faire appel à des examens biologiques peu fiables pour le diagnostic de la maladie de Lyme, au détriment des malades et du budget de la Sécurité Sociale ?

Fait à Strasbourg, le 24 août 2017.