

Rapport annuel d'activité

2014

**Centre National de Référence
de la coqueluche et autres
bordetelloses**

**Année d'exercice
2013**



SOMMAIRE

RESUME ANALYTIQUE.....	4
1 <u>MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR</u>.....	5
2 <u>ACTIVITÉS D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2013</u>.....	6
2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2013.....	6
2.2 Nature des échantillons reçus au CNR en 2013.....	6
2.2.1 Nombre de prélèvements biologiques	7
2.2.2 Nombre d'isolats cliniques appartenant au genre <i>Bordetella</i>	7
2.3 Nombre de PCR réalisées en 2013	9
2.4 Nombre de sérologies réalisées.....	9
2.5 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	10
2.6 Distribution des standards et divers produits biologiques	10
3 <u>ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE</u>	10
3.1 Participation à des réseaux de surveillance	10
3.2 Surveillance de l'évolution de la coqueluche.....	11
3.3 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche	12
3.3.1 Infections humaines à <i>B. bronchiseptica</i>	12
3.3.2 Autres bordetelloses humaines.....	12
3.4 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux.....	12
3.4.1 Antibiotiques	12
3.4.2 Vaccins	12
3.5 Détection et investigation de cas groupes et de phénomènes anormaux	13
3.6 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens.....	13
3.6.1 Europe	13
3.6.2 International	13
3.7 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	13
4 <u>ALERTE</u>.....	14
5 <u>ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL</u>.....	14
5.1 Nombre d'appels et de messages.....	14
5.2 Activités d'enseignement.....	15
5.3 Expertise	16
6 <u>TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR</u>.....	16
6.1 Introduction et résumé des travaux réalisés de 1989 à 2013.....	16
6.2 Recherches effectuées par le Centre National de Référence en 2013.....	18
6.2.1 Polymorphisme et évolution spatio-temporelle des espèces de <i>Bordetelles</i>	19
6.2.2 Techniques de diagnostic des bordetelloses par PCR en temps réel (PCR-TR)	22
6.2.3 Développement d'une PCR spécifique de <i>B. parapertussis</i> et <i>B. bronchiseptica</i>	22
6.2.4 Analyse de la durée de l'immunité induite par les vaccins coquelucheux acellulaires.....	22
6.3 Recherches effectuées par l'unité de recherche, en relation avec l'activité du Centre National de Référence en 2013	22
6.3.1 Comment évoluent les populations de <i>Bordetella pertussis</i> et de <i>Bordetella parapertussis</i> au cours du temps en France ?	23
6.3.2 Comment évolue la population de <i>Bordetella pertussis</i> au cours du temps dans d'autres pays ayant des stratégies vaccinales différentes ?.....	26
6.3.3 Quelle est l'épidémiologie de la coqueluche à Bucarest ?	27
6.4 Communications nationales (toutes sur invitation)	27

6.5	Communications internationales (toutes sur invitation)	28
6.6	Publication nationale	29
6.7	Publications internationales	30
7.	<u>COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE</u>	31
	<u>Annexe 1 : Missions et Organisation du CNR</u>	32
1.1	MISSIONS	32
1.2	EQUIPE.....	32
1.3	LOCAUX.....	34
1.4	DEMARCHE QUALITE.....	35
	<u>ANNEXE 2 : Capacités Techniques du CNR</u>	38
2.1	IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES BACTERIES DU GENRE BORDETELLA.....	38
2.2.	CONSTITUTION D'UNE COLLECTION	39
2.3	LISTE DES DIAGNOSTICS BIOLOGIQUES UTILISES ET RECOMMANDES PAR LE CNR POUR LA SURVEILLANCE DES BORDETELLOSES	39

RESUME ANALYTIQUE

En 2013,

- Le cycle de coqueluche qui a commencé en 2012 s'est poursuivi en 2013 ;
- 15 % des isolats de *Bordetella pertussis* n'expriment plus la pertactine, un des composants antigéniques de certains vaccins coquelucheux acellulaires tout comme, depuis 2007, 95 % des isolats de *Bordetella parapertussis* ;
- L'estimation de la durée de l'immunité induite par les vaccins coquelucheux acellulaires est d'environ 6 ans après le rappel à 16-18 mois ;
- Une PCR en temps réel pour la détection de matériel génétique de *Bordetella parapertussis*, a été développée ;
- Le CNR a participé à un contrôle de qualité externe (QCMD).

1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Le Centre National de Référence (CNR) de la coqueluche et autres bordetelloses, a poursuivi en 2013 ses différentes missions concernant les infections humaines dues aux bactéries du genre *Bordetella* dans l'unité de recherche « Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines » (PTMMH) de l'Institut Pasteur. Ces missions sont listées en annexe 1, seules sont indiquées ici les plus importantes réalisées en 2013 :

- **Poursuite de la surveillance des bordetelloses.** Cette surveillance s'avère toujours nécessaire et indispensable car :
 - seuls les vaccins coquelucheux sous-unitaires ou acellulaires (Ca) sont maintenant utilisés, comme dans toute l'Europe. Le type d'immunité vaccinale induite est différente des vaccins coquelucheux à germes entiers (Ce) utilisés auparavant et la durée de l'immunité qu'ils induisent a été re-estimée régulièrement chez l'enfant en fonction des modifications des isolats mais doit être estimée aussi chez l'adulte maintenant ;
 - la stratégie vaccinale a été modifiée en 2013 avec un schéma 2+1 et un rappel à 6 ans à la place d'un schéma 3+1 avec un rappel à 16-18 mois, sans rappel à 6 ans. De plus les valences diphtérie et coquelucheuse des vaccins coquelucheux acellulaires (ca) sont plus faibles pour les adolescents en comparaison avec l'ancien schéma ;
 - les seuls diagnostics biologiques remboursés, la culture et la "PCR en temps réel" (PCR-TR), sont soit très spécifiques mais peu sensibles chez l'adulte pour la culture, soit très sensibles mais moins spécifiques et surtout très délicats pour la PCR-TR. Pour cette raison, de nouvelles PCR plus spécifiques ont été développées. Parallèlement, nous avons continué à pratiquer des contrôles qualité pour des laboratoires effectuant ces diagnostics et d'évaluer les troussees qui sont régulièrement mises sur le marché.

2 ACTIVITÉS D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2013

La description des techniques disponibles est présentée en Annexe 1.

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2013

- Techniques développées ou en développement :

Deux techniques ont été développées et sont utilisées maintenant en routine au laboratoire :

- une technique de PCR-TR permettant la détection spécifique de *B. paraptussis* (Ref 13) ;
- une technique de PCR-TR permettant de détecter de façon différentielle *B. paraptussis* et *B. bronchiseptica* (Ref 13)

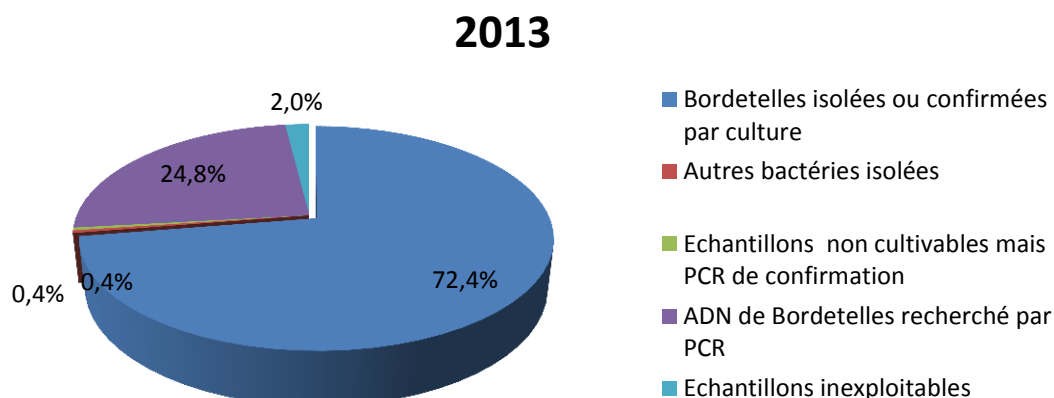
- Techniques transférées vers d'autres laboratoires :

Les techniques de diagnostic biologique de la coqueluche par PCR-TR recommandées suite aux réunions de consensus européen (ECDC) sont régulièrement transmises aux laboratoires demandeurs qu'ils soient hospitaliers ou de biologie médicale. Par ailleurs, ils ont été transmis à plusieurs Instituts Pasteur répartis dans le monde (St Pétersbourg, Bucarest, Rome, Alger, Casablanca, Tunis, Téhéran).

2.2 Nature des échantillons reçus au CNR en 2013

Le CNR a reçu majoritairement des isolats cliniques ainsi que des prélèvements biologiques en provenance des laboratoires hospitaliers du réseau RENACOQ, du collège CBVH et quelquefois de LBM (Figure 1).

Figure 1 : Répartition des échantillons (isolat ou prélèvement) reçus au CNR en 2013



2.2.1 Nombre de prélèvements biologiques

L'ensemble des prélèvements biologiques reçus au laboratoire est géré informatiquement à l'aide du logiciel Lagon. Les prélèvements biologiques (aspiration naso-pharyngée, expectoration, sérum, ADN extrait de prélèvement respiratoire) que nous avons reçus en 2013 provenaient essentiellement de :

- patients infectés par *B. pertussis* soit hospitalisés soit lors d'infection communautaire et dont les prélèvements sont envoyés par les cliniciens participant au réseau RENACOQ (n=14) ;
- patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (crèches, établissements scolaires, usines) (n=21) ;
- patients infectés par *B. bronchiseptica* ou d'animaux infectés par cette bactérie ou par d'autres espèces de Bordetelles et envoyés par A. Le Coustumier (Hôpital de Cahors) et les bactériologistes du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux de France (n=9) ;
- l'unité de recherche a reçu des prélèvements dans le cadre de la surveillance ACTIV (n=19).

2.2.2 Nombre d'isolats cliniques appartenant au genre *Bordetella*

Nous avons reçu en 2013 : 184 isolats cliniques du genre *Bordetella*, 1 isolat d'un autre genre bactérien et 1 isolat non cultivable mais qui a pu être identifié comme *Bordetella pertussis* par PCR (Figure 1).

Dans le cadre du réseau RENACOQ :

- 142 isolats de *B. pertussis*
- 13 isolats de *B. parapertussis*

Provenant du Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des Hôpitaux de France :

- 13 isolats de *B. pertussis* en provenance d'Annecy (x4), de Versailles (x3) et de Saint Etienne (x6) ;
- isolats de *B. parapertussis*, en provenance d'Annecy (x2) et du pôle d'identification bactérienne de l'Institut Pasteur (x1) ;
- 10 isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine en provenance de Lyon (x1), de Necker-Paris (x1), de Poitiers (x2), de Tourcoing (x1), de Douai (x1), de Montauban et de Dinan (x1)
- 1 isolat de *B. hinzii* en provenance de Rennes

Le nombre d'isolats cliniques de *B. pertussis* reçus en 2013 au CNR, est semblable à celui de 2012 (Figure 2 et Tableau 1)

Figure 2 : Répartition par espèce de Bordetelles reçues ou isolées au CNR en 2013

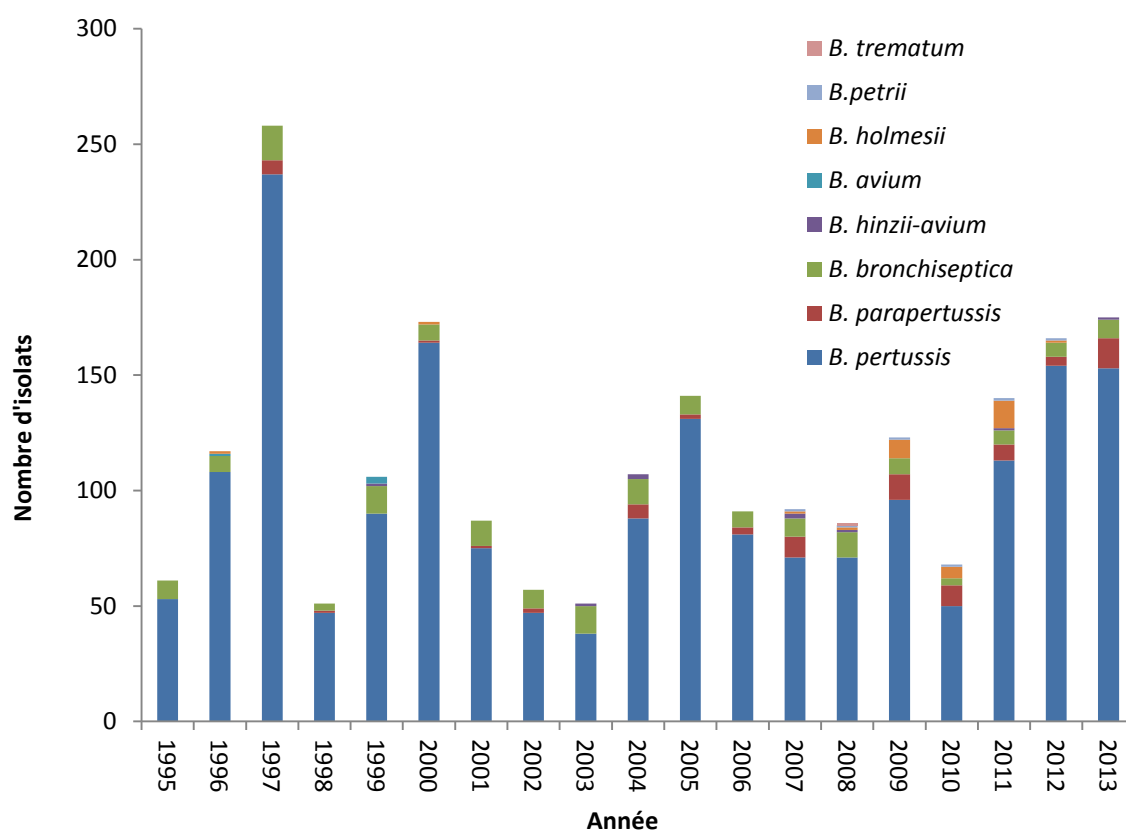


Tableau 1 : Répartition par année des principales espèces responsables de bordetelloses humaines

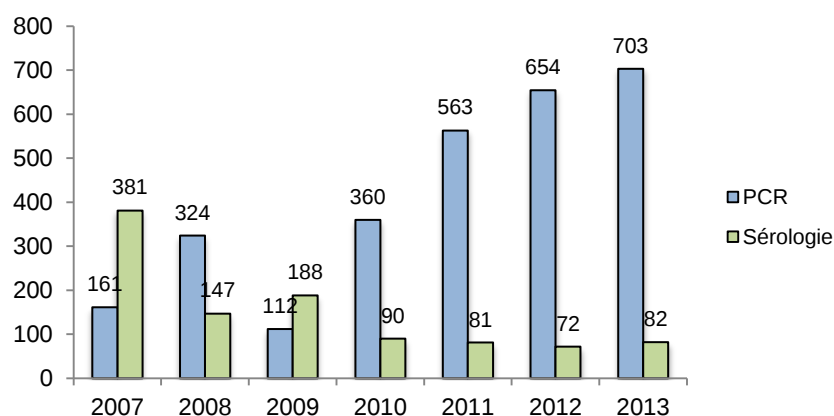
ANNEES ESPECES	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<i>B. pertussis</i>	108	237	47	90	164	75	47	38	88	129	81	71	71	96	50	113	154	155
<i>B. parapertussis</i>	0	6	1	0	1	1	2	0	6	2	4	9	0	11	9	7	4	16
<i>B. bronchiseptica</i>	7	15	3	12	7	11	8	7	11	8	3	8	11	7	3	6	6	10
<i>B. holmesii</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	8	5	12	1	0

2.3 Nombre de PCR réalisées en 2013

Nous avons réalisé 703 PCR en temps réel (Figure 3) :

- 177 dans le cadre de la surveillance RENACOQ
- 141 dans le cadre de demande des ARS/CIRE pour des cas groupés de coqueluche dans des collectivités (école ou ehpad)
- 109 dans le cadre du test d'une trousse commerciale multiplexée
- 276 dans le cadre du contrôle de qualité externe (QCMD)

Figure 3 : Diagnostics biologiques, enquêtes collaboratives et CQ réalisés par le CNR pour les années 2007 à 2013



2.4 Nombre de sérologies réalisées

En 2013, nous avons réalisé 82 sérologies dans le cadre de la surveillance des

bordetelloses et pour l'EQA européen.

La figure 3 montre la comparaison du nombre de PCR et sérologies réalisées de 2007 à 2013. Le nombre de sérologies demandées au CNR est stationnaire en 2013 par rapport aux années précédentes alors que le nombre de PCR a sensiblement augmenté depuis 2011. Cette augmentation s'explique par le fait que le CNR utilise un plus grand nombre de cibles de PCR pour identifier ou confirmer l'identification des différentes espèces de Bordetelles.

2.5 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous envoyons régulièrement les modes opératoires décrivant les diagnostics de référence (culture ou PCR) aux laboratoires hospitaliers ou LBM qui en font la demande.

2.6 Distribution des standards et divers produits biologiques

Nous continuons d'envoyer régulièrement à des laboratoires hospitaliers français, européens, américains, ou à des laboratoires de biologie médicale des souches de référence des différentes espèces de Bordetelles, ainsi que des ADN de référence purifiés.

3 ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE

3.1 Participation à des réseaux de surveillance

Nous poursuivons la collaboration avec :

- avec l'InVS et les 42 hôpitaux du réseau RENACOQ depuis 1996 (Figure 4)
- le Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des hôpitaux
- le réseau ACTIV, réseau de 55 pédiatres en ambulatoire **et la participation de l'unité de recherche**
- le réseau européen EUPERSTRAIN **et la participation de l'unité de recherche**
- le CDC nord-américain **et la participation de l'unité de recherche**

Figure 4 : Répartition des hôpitaux du réseau RENACOQ



3.2 Surveillance de l'évolution de la coqueluche

En 2013, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et à *B. parapertussis*. L'analyse des données obtenues pour 2013 n'est pas encore terminée. Le nombre d'isolats reçus au CNR par le réseau (Figure 2 et Tableau 1) en 2013 est semblable à celui reçu en 2012, confirmant le cycle de coqueluche 2012-2013. Une diminution du nombre de cas s'amorce depuis fin 2013. Depuis 1991, des cycles de coqueluche ont été observés, comme indiqué dans la figure 2, en 1994, 1997, 2000, c'est-à-dire tous les trois ans, et en 2005. Cette fois 7 ans après. **L'augmentation de l'intervalle est-il dû à l'augmentation de la couverture vaccinale ? Pour répondre à cette question, Il est donc important que l'action du réseau RENACOQ se poursuive, afin d'évaluer précisément cet impact dans les dix prochaines années, ceci avec des diagnostics spécifiques (Réf. 11) !**

En 2013, l'âge des patients (154) sur lesquels ont été collectés les isolats est comparable à celui des années 2011 et 2012 avec 60 % des isolats collectés chez des nouveau-nés de moins de 6 mois et 12 % chez des plus de 16 ans.

L'analyse des isolats collectés en 2013 montre un arrêt de l'augmentation du nombre d'isolats de *B. pertussis* corrélant probablement avec la fin du cycle de coqueluche. Les infections à *B. parapertussis* sont toujours rares mais il faut signaler une légère augmentation de ces infections depuis 2007 (Figure 2, Tableau 1)

3.3 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

3.3.1 Infections humaines à *B. bronchiseptica*

La surveillance de ces infections s'est poursuivie. Il s'agit de cas d'infections à *B. bronchiseptica* d'une part chez un nourrisson de 3 mois ayant une bronchiolite et d'autre part, chez un enfant de 10 ans atteint de mucoviscidose. Les autres cas d'infections concernent des adultes immunodéprimés de plus de 50 ans (51, 61, 65, 69, 77 et 82 ans) dont plusieurs sont atteints de symptômes respiratoires.

3.3.2 Autres bordetelloses humaines

Nous avons reçu en 2013 :

- 1 isolat collecté chez un patient, âgé de 43 ans, ayant une exacerbation infectieuse de dilatation des bronches dans un contexte d'immunodépression et de polypathologie (patient antérieurement hospitalisé pour leucémie aiguë myéloïde de type II et autogreffé en 2012).

3.4 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux

3.4.1 Antibiotiques

Aucun isolat de *B. pertussis* ou *B. parapertussis*, résistant aux macrolides, a été identifié en 2013. Cependant, la surveillance doit continuer car deux publications récentes indiquent la circulation d'isolats résistants en Chine.

3.4.2 Vaccins

La surveillance des isolats qui pourraient être résistants à l'immunité vaccinale se fait d'une part, par génotypage et typage (ECP) et d'autre part, par l'analyse de la production de toxines et adhésines majeures. Dès qu'un isolat présente des propriétés différentes, sa pathogénicité dans le modèle murin d'infection intranasale est testée ainsi que sa pathogénicité vis-à-vis de cellules phagocytaires.

3.5 Détection et investigation de cas groupes et de phénomènes anormaux

En 2013, nous avons apporté une aide au diagnostic lors de cas groupés d'infections respiratoires par téléphone et par courriel (Figure 5)

3.6 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

3.6.1 Europe

Nous continuons à faire partie du réseau européen **EUpertstrain** et nous échangeons, outre des isolats cliniques, des modes opératoires ou nous réalisons des enquêtes inter-laboratoires. Nous nous réunissons une fois par an. Notre collaboration a donné lieu à une publication (**Ref 2**).

3.6.2 International

L'unité de recherche qui héberge le CNR, a continué sa mission de formation au sein des Instituts Pasteur du Réseau International afin de maintenir un réseau de surveillance de maladies à prévention vaccinale (réseau SURVAC). En 2013 l'unité de recherche a poursuivi sa collaboration avec Tunis, Alger, Téhéran et Saint-Petersbourg et a établi des collaborations avec Casablanca, et Bucarest.

3.7 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

A l'initiative de l'InVS, nous avons participé à une étude afin de déterminer la durée de l'immunité induite par les vaccins coquelucheux. Nous étions en charge de la vérification des diagnostics biologiques.

Nous continuons à avoir les données des laboratoires CERBA concernant l'évolution de l'utilisation des diagnostics biologiques en France. Le nombre de PCR réalisées par le laboratoire Cerba en 2013 a augmenté **d'un facteur de 1,1 par rapport à 2012 mais 1,8 par rapport à 2011, confirmant l'augmentation du nombre de cas lors du cycle de coqueluche**. A l'inverse, les demandes de sérologies à ce laboratoire ont continué à diminuer. Ces données indiquent que les recommandations du CSHPF de 2008 (http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspa20080905_coqueluche.pdf) concernant le diagnostic biologique **commencent** à être suivies et corrélent avec le fait que le diagnostic par PCR-TR est maintenant remboursé. **Malheureusement il y a toujours 23572 sérologies**

pratiquées alors que ce diagnostic biologique n'est plus remboursé !

Tableau 2 : Nombre de PCR et sérologies réalisées au départ par le CBMS de l'Institut Pasteur puis par le laboratoire Cerba

ANNEES	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
DIAGNOSTICS																
PCR	1230	1073	2595	1616	1609	1176	1603	2500	2184	2271	2306	2588	2133	7611	13115	14341
Sérologie	11330	8665	13628	14165	13181	14293	17492	46606	49500	68803	77537	65318	42779	32742	25306	23572

Sur les 14341 PCR, 2196 (15.3%) étaient positives « Bordetella » (*B. pertussis* ou *B. holmesii* ou *B. bronchiseptica*) et 0,6% étaient positives à « Bordetella » (*B. parapertussis* ou *B. bronchiseptica*).

4 ALERTE

Lors de cas groupés de coqueluche, le CNR demande de prévenir l'InVS et les ARS. Le CNR envoie par courriel le calendrier vaccinal, l'avis du HCSP et les Flash Info et conseille sur les diagnostics biologiques à utiliser.

5 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

Nous avons poursuivi nos missions d'enseignements, de formation et d'accueil de stagiaires.

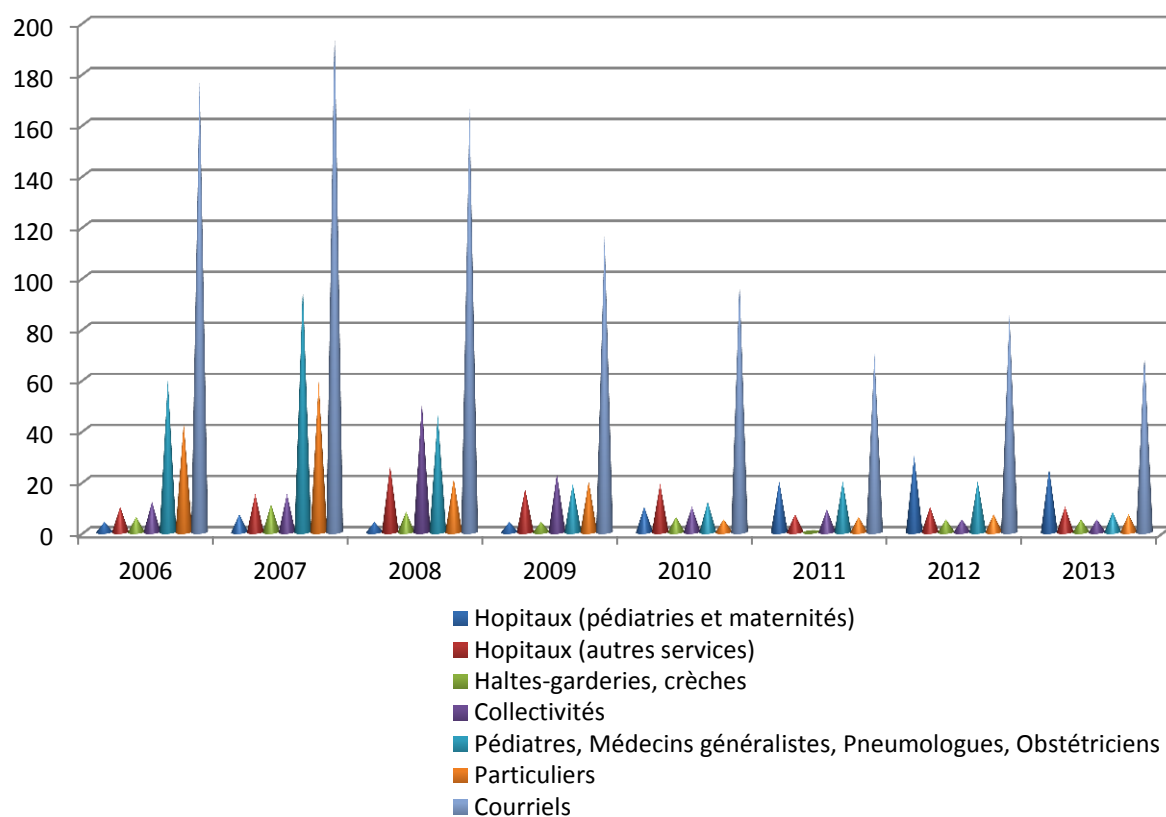
Les informations concernant le CNR sont sur notre site web (http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadre_cnr/bordet-index.html) et sont régulièrement mises à jour.

5.1 Nombre d'appels et de messages

En 2013, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel. La comparaison avec les années

précédentes est indiquée dans la figure 5.

Figure 5 : Sollicitations téléphoniques ou par courriels du CNR Coqueluche pour les années 2006 à 2013



5.2 Activités d'enseignement

Nicole Guiso

Dans le cadre du cours Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque 2012-2013 : « Evolution de l'épidémiologie des maladies infectieuses en fonction de la vaccination : exemples de la coqueluche et de la diphtérie »

Paris – le 13 février 2013 (3h)

Dans le cadre du cours AgroParisTech 2013 : « Introduction à l'immunologie sur le thème de la vaccination » Paris – le 5 mars 2013 (1h30)

Dans le cadre du cours Vaccinology, 2013: « Of the importance of following epidemiology upon vaccination: the example of Pertussis and Diphtheria vaccines »

Paris – le 26 mars 2013 (1h30)

Dans le cadre du cours de Bactériologie Médicale 2013 : « Le genre *Bordetella* »
Paris-23 avril 2013 (3h30)

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2013 : « Le genre *Bordetella* : évolution depuis l'introduction de la vaccination coquelucheuse » Paris – le 18 septembre 2013 (1h30)

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-Sud à Chatenay Malabry : "*B. pertussis* et les vaccins coquelucheux" - le 22 octobre 2013 (3 heures).

5.3 Expertise

Nicole Guiso participe au groupe de travail sur la stratégie vaccinale et sur les recommandations lors de cas groupés de coqueluche.

Nicole Guiso participe au groupe de travail du comité SAGE de l'OMS.

Nicole Guiso et Sophie Guillot participent aux groupes de travail sur la rédaction des recommandations concernant les diagnostics biologiques de la coqueluche au niveau de l'ECDC.

6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

6.1 Introduction et résumé des travaux réalisés de 1989 à 2013

Nos recherches ont porté essentiellement sur la pathogénicité des bordetelles classiques, *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* et sur leurs interactions avec leur hôte, à l'aide d'un modèle murin d'infection respiratoire, de modèles cellulaires et d'enquêtes épidémiologiques. Ces recherches ont été entreprises afin de mieux comprendre la physiopathologie des infections à *Bordetella*, caractériser les protéines intervenant dans leur pathogénicité, analyser l'évolution des populations bactériennes dans différents environnements, améliorer les moyens de diagnostic et de prévention contre ces bactéries et

mettre au point des outils thérapeutiques contre ces bactéries.

Les protéines bactériennes exprimées par les trois espèces les plus étudiées du genre *Bordetella* ont dès leur mise en évidence été classées en adhésines, et toxines. Les principales adhésines sont l'hémagglutinine filamenteuse ou FHA, les protéines fimbriales ou Fim (Fim 2 et 3), la pertactine ou PRN. Les principales toxines sont la toxine de pertussis ou PT, toxine ADP-ribosylante, l'adényl cyclase-hémolysine ou AC-Hly, toxine RTX, la toxine BteA, effecteur du système de sécrétion III, la toxine dermonécrotique ou TDN, et la toxine cytotrachéale ou TCT. Seule la PT, comme toxine et la FHA, la PRN et les Fim comme adhésines entrent dans la composition des vaccins sous-unitaires.

Les recherches de notre unité ont consisté :

- à standardiser le modèle murin d'infection respiratoire par voie intranasale,
- à déterminer le rôle des différentes toxines et adhésines au cours de l'infection à l'aide de ce modèle ;
- à caractériser le rôle de l'AC-Hly en tant que toxine ;
- à montrer qu'elle agit en synergie avec la PT dans le cas d'une infection par *B. pertussis* ;
- à caractériser les réponses après infection et après vaccination chez la souris mais aussi chez l'homme. Nous avons pu, en particulier, montrer que la vaccination par des vaccins sous-unitaires composés de protéines issues de l'espèce *pertussis* induisait une immunité protectrice vis-à-vis de *pertussis* mais pas vis-à-vis de *parapertussis*, ce qui pourrait provoquer un changement d'épidémiologie au moment où les vaccins Ca remplaceraient les vaccins Ce.

A l'aide de modèles cellulaires, plusieurs observations ont été faites. *B. pertussis*, *parapertussis* et *bronchiseptica* ont un pouvoir invasif très faible dans les cellules épithéliales trachéales humaines spécifiques. Les espèces *pertussis* et *parapertussis* ne sont pas cytotoxiques pour ces cellules mais l'espèce *bronchiseptica* l'est par nécrose. Les trois espèces sont capables d'être invasives mais ne persistent pas et ne se multiplient pas. Elles sont ensuite dégradées, même l'espèce *bronchiseptica* qui est cytotoxique. En ce qui concerne les cellules phagocytaires, *B. pertussis* est cytotoxique et provoque leur mort par apoptose. Cette action spécifique est due à l'expression de l'AC-Hly. L'espèce *bronchiseptica* de nouveau est cytotoxique induisant la mort cellulaire par nécrose et non par apoptose spécifiquement due à l'action de BteA.

La population de *B. pertussis* qui est peu polymorphe évolue avec le temps, avec une diminution de la diversité génétique, dans les régions où la couverture vaccinale des enfants est très élevée avec un vaccin Ce. Les isolats semblables aux souches vaccinales ne circulent plus indiquant l'efficacité du vaccin Ce à induire une immunité apte à contrôler l'infection due à des isolats semblables aux souches vaccinales. Cependant, des isolats différents des souches vaccinales continuent à circuler et sont toujours aussi virulents. Ces isolats ont perdu du matériel génétique par rapport aux souches vaccinales. Cette perte, médiée par des séquences d'insertion, ne concerne pas les gènes de virulence et c'est pourquoi les isolats circulant sont toujours aussi virulents. Depuis une décennie, les vaccins Ca sont utilisés dans les pays Nord-Américains et Européens. Les vaccins Ca induisant une immunité différente des vaccins Ce, il est important de poursuivre la surveillance des espèces bactériennes ciblées par le vaccin.

Parallèlement à cette recherche, nous avons participé à partir de 1990 à un certain nombre d'enquêtes avec des pédiatres hospitaliers et des médecins généralistes. Elles ont permis de montrer le changement d'épidémiologie en France depuis l'introduction de la vaccination généralisée en 1966 avec des vaccins combinés (D-T-Polio-Coq-Hib). Ces différentes enquêtes ont montré que les adolescents et les adultes, dont l'immunité a diminué au cours du temps constituent un réservoir pour les jeunes nourrissons trop jeunes pour être vaccinés. Ces observations ont amené le Comité Technique des Vaccinations Français à introduire un rappel vaccinal pour les adolescents à 11-13 ans en 1998, pour les jeunes adultes et le personnel hospitalier en contact avec les nourrissons en 2004, pour tous les personnels de profession médicale, y compris ceux travaillant dans les collectivités de personnes âgées et pour tous les adultes n'ayant pas eu de rappel vaccinal depuis dix ans à l'occasion d'un rappel décennal ou lors d'un projet parental pour les futurs parents mais aussi pour tous les adultes qui seront dans l'entourage du bébé et en 2008 pour tous les adultes à l'occasion du rappel à 27-28 ans et pour tout le personnel hospitalier. De plus des recommandations ont été rédigées pour la conduite à tenir lors de cas de coqueluche groupés.

6.2 Recherches effectuées par le Centre National de Référence en 2013

6.2.1 Polymorphisme et évolution spatio-temporelle des espèces de Bordetelles

Espèces *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*

Comme mentionné les années précédentes, l'un des aspects de la maladie à prévention vaccinale qu'est la coqueluche est l'analyse fine du polymorphisme de son agent et le contrôle de sa circulation par l'immunité de la population humaine.

La majorité des isolats, collectés en 2013, ont les caractéristiques bactériologiques habituelles. Ils expriment en majorité la protéine fimbriale 3 (93 % ; 6 % la protéine fimbriale 2 et 1 % aucune des protéines fimbriales). Tous les isolats expriment l'AC-Hly. Leur typage par la technique d'électrophorèse en champs pulsés (ECP) montre qu'ils appartiennent tous au groupe ECP IV (Figure 6A). La répartition en sous-groupe (ECP) ne montre pas de changement depuis 2008. La circulation du sous-groupe IV_γ, apparu en 2003 ne semble pas augmenter (Figure 6B).

La majorité des isolats collectés et testés expriment les toxines et adhésines. L'allèle du promoteur du locus codant la PT est de type 3, de la sous-unité A de la PT est de type *ptxA1* et celui de la PRN est de type *prn2*, comme la plupart des isolats circulant depuis 1990. Cependant, il est important de noter que depuis 2005 des isolats n'exprimant pas un des antigènes vaccinaux, la PRN, circulent. La proportion de ces isolats a augmenté d'année en année et a atteint 14 % en 2012. Cette proportion a été stationnaire en 2013.

Par ailleurs, 95 % des isolats de *B. parapertussis* n'expriment plus la PRN depuis 2007. De plus, un nouveau groupe ECP a été mis en évidence. Ce groupe ECP, appelé BPPII, comprend 77 % des isolats récemment collectés.

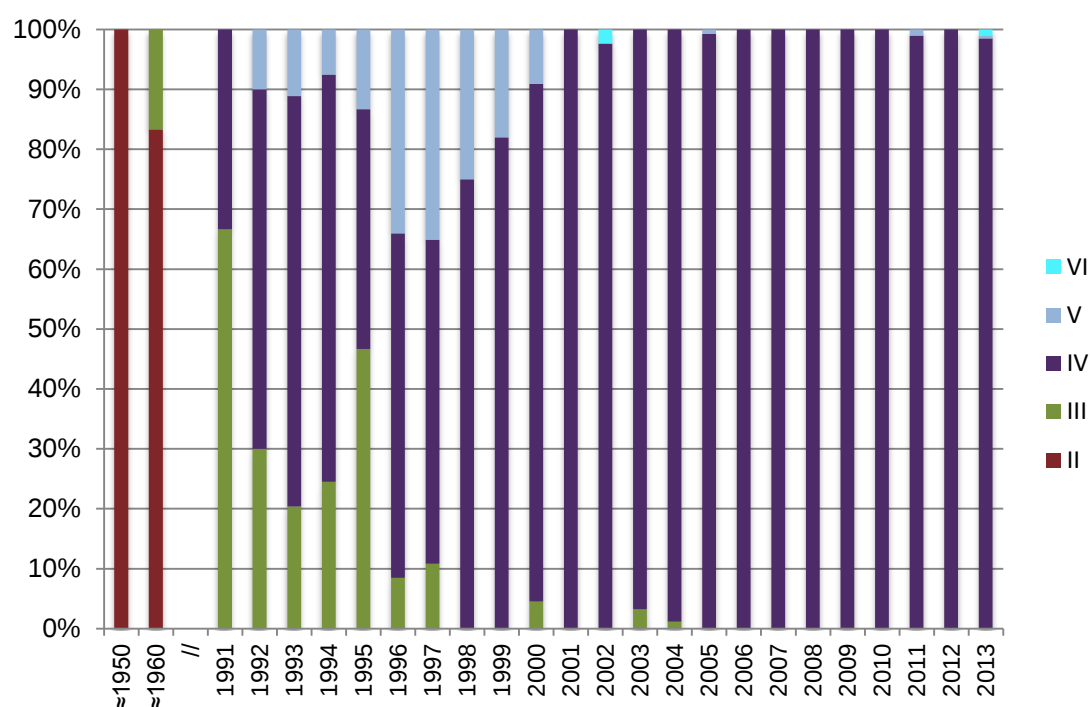
En conclusion, on peut donc souligner que 15 ans après l'introduction des vaccins sous-unitaires en France,

- **il y a une stabilité des isolats de *B. pertussis* analysés par ECP mais une augmentation des isolats n'exprimant pas un antigène vaccinal, principalement la PRN ;**
- **il y a une évolution des isolats de *B. parapertussis* analysés par ECP et une perte de production de la PRN par la majorité des isolats collectés depuis 2007.**

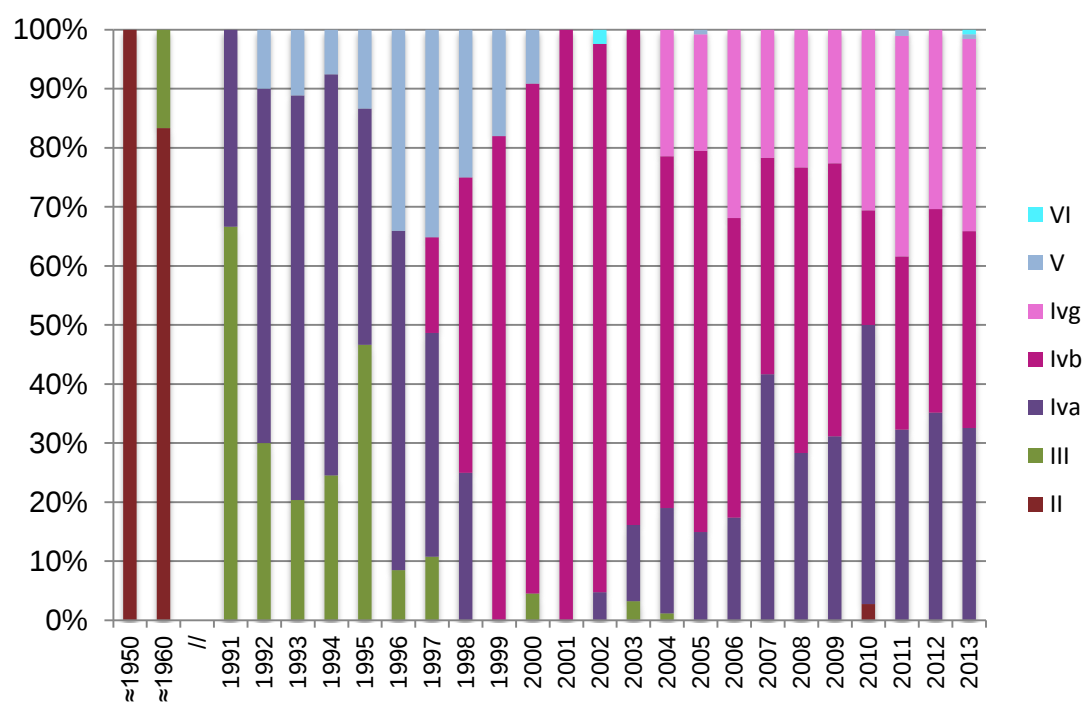
Ces isolats émergents font-ils partie d'un clone ? D'après les données de l'unité de recherche ce n'est pas le cas (Réf. 11).

Figure 6 : Répartition des isolats de *B. pertussis* par groupe d'ECP

A



B



Espèce *Bordetella holmesii*

B. holmesii est une espèce du genre *Bordetella* qui est généralement décrite comme causant des bactériémies chez des patients aspléniques ou drépanocytaires, mais elle est aussi isolée sur des prélèvements respiratoires.

Les isolats de *B. holmesii* sont très proches les uns des autres par ECP. Leur comparaison génomique a été réalisée par l'unité de recherche (Ref 7)

En 2012, nous avons décrit pour la première fois (Ref 9) un patient hospitalisé à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière plusieurs fois, pour un lymphome contrôlé après auto-greffe et plusieurs chimio-thérapies, atteint d'érésipèle, et chez lequel *B. holmesii* a été isolée plusieurs fois dans des hémocultures mais aussi porteur asymptomatique de cette bactérie au niveau pharyngé. La bactérie n'a plus été isolée après l'arrêt du traitement par rituximab. **L'hypothèse est que les bactériémies à *B. holmesii* s'observeraient chez des patients porteurs asymptomatiques de cette bactérie au niveau naso-pharyngé.** Or la recherche de la bactérie au niveau naso-pharyngé ne se fait que lors de cas groupés d'infections à *B. pertussis* mais pas dans d'autres occasions.

En 2013, cette hypothèse semble se confirmer car nous avons eu le cas d'un adolescent asthmatique, n'ayant pas eu son rappel coquelucheux à 11-13 ans, diagnostiqué comme ayant une infection à *B. holmesii* en Espagne (nous avons transmis le mode opératoire de la PCR-TR à ce laboratoire), plus d'un mois après le début de la toux. Quinze jours après la maman, n'ayant pas eu de rappel vaccinal coquelucheux, a des symptômes coqueluchoïdes et sans aucun diagnostic biologique le médecin déclare que c'est une infection à *B. holmesii*. Quinze jours plus tard la grand-mère, n'ayant jamais été vaccinée, a des symptômes coqueluchoïdes, une PCR-TR est pratiquée en France et le médecin dit infection à *Bordetella* mais nous envoie le prélèvement et nous confirmons *B. pertussis* !!

En conséquence l'adolescent avait eu la coqueluche mais avait en plus un portage de *B. holmesii* (*B. pertussis* n'avait pu être isolée et son ADN détecté car le prélèvement avait été fait trop longtemps après le début de la toux) et avait évidemment contaminée sa mère et sa grand-mère. Les symptômes étaient dus à *B. pertussis* et non *B. holmesii* !

6.2.2 Techniques de diagnostic des bordetelloses par PCR en temps réel (PCR-TR)

Détermination de la sensibilité des différentes PCR en temps réel développées au laboratoire

En 2011, la sensibilité du nombre de CFU détecté par les cinq PCR-TR que nous avons développées au CNR avait été déterminée. Ces sensibilités sont les suivantes :

IS481 : 0,5 CFU par réaction

IS1001 : 1 CFU par réaction

PtxA-Pr : 50 CFU par réaction

BP3385 : 30 CFU par réaction

Bho RecA : 30 CFU par réaction

En 2012 nous avons développé une PCR spécifique de *B. holmesii* plus sensible que celle basée sur le gène *RecA* car elle est basée sur des séquences d'insertion : h-IS1001. Sa sensibilité est de 0,2 CFU par réaction.

6.2.3 Développement d'une PCR spécifique de *B. paraptussis* et *B. bronchiseptica*

Après plusieurs années d'investigation, nous avons développé un test original en deux temps qui cible la région promotrice du gène *flaA* codant le flagelle. Une première PCR-TR amplifie tous les isolats de *B. bronchiseptica* mais aussi l'espèce *B. paraptussis* et une seconde PCR-TR qui amplifie spécifiquement l'espèce *B. paraptussis*. Ce test en deux temps permet, in fine, de faire la différence entre les deux espèces. Ces travaux ont fait l'objet de la rédaction d'un article qui a été accepté en décembre 2013 pour publication dans le journal DMID (Ref 13).

6.2.4 Analyse de la durée de l'immunité induite par les vaccins coquelucheux acellulaires

Cette étude, coordonnée par l'InVS est réalisée par le réseau Sentinelle et le CNR. Elle consiste à confirmer ou à infirmer que les enfants nés en 2001-2002 et atteints de symptômes coqueluchoïdes ont une infection causée par *B. pertussis* ou *B. paraptussis*, ceci à l'aide de nos PCR-TR spécifiques.

6.3 Recherches effectuées par l'unité de recherche, en relation

avec l'activité du Centre National de Référence en 2013

En 2013, les principales questions auxquelles nous avons essayé de répondre sont les suivantes :

- ❖ Comment évoluent la population de *Bordetella pertussis* et celle de *Bordetella parapertussis* au cours du temps en France depuis l'utilisation des vaccins acellulaires ?
- ❖ Comment évolue la population de *Bordetella pertussis* au cours du temps dans des pays ayant des stratégies vaccinales différentes ?
- ❖ Quelle est l'épidémiologie de la coqueluche à Bucarest ?

6.3.1 Comment évoluent les populations de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis* au cours du temps en France ?

Caractéristiques de la population de *Bordetella pertussis*

La réponse à la question posée peut être obtenue en comparant les isolats de l'ère pré-vaccinale à ceux de l'ère post-vaccinale pendant laquelle était utilisé un vaccin Ce et ceux de l'ère post-vaccinale actuelle depuis que nous utilisons des vaccins Ca. Nous avons pu montrer lors des années précédentes une évolution de la population de *B. pertussis* en France à l'aide de la technique ECP mais aussi à l'aide de plusieurs techniques de génomique telles que l'hybridation soustractive, les puces à ADN et le séquençage des génomes (Ref 11). Il a pu être mis en évidence une influence certaine de l'immunité de la population sur la population bactérienne. En effet, la vaccination avec le vaccin Ce a permis le contrôle des isolats semblables aux souches vaccinales. Malheureusement, des isolats circulaient toujours et ils étaient aussi virulents que ceux de l'ère pré-vaccinale (Ref 11). De plus, nous avons pu montrer que le génome des isolats circulant avait diminué.

Ces différentes études nous avaient permis de formuler une hypothèse sur l'évolution des isolats circulant dans des régions utilisant des vaccins Ca et où la couverture vaccinale est de plus en plus élevée. Ces vaccins ciblent la virulence des isolats et non l'ensemble de la bactérie. Comme tous les isolats qui continuent à circuler sont virulents et que la couverture vaccinale augmente avec les rappels adolescents et adultes, une diminution de la circulation des isolats virulents devrait être observée. La présence d'un grand nombre de copies de séquences d'insertion sur le chromosome des isolats actuels pourrait faciliter la délétion des gènes de virulence. Il s'avère que nous n'avons

pas pu mettre en évidence de nouvelles différences au niveau du génome par ECP mais certaines ont été observées au niveau de la production des protéines bactériennes et en particulier, les antigènes vaccinaux. Pour cette raison nous avons poursuivi nos analyses au niveau génomique mais aussi au niveau transcriptomique et protéomique.

Au niveau génomique

Huit isolats collectés soit durant l'ère pré-vaccinale (2) soit l'ère vaccin post-Ce (1) soit l'ère post-Ca (5) indiquent une augmentation temporelle des « single nucleotide polymorphisms ou SNP » ; 25% étant synonymes c'est-à-dire silencieux au niveau de la séquence protéique mais 40% non synonymes et donc pouvant impacter directement le protéome de la bactérie. Un point important est que les gènes codant l'AC-Hly, la FHA et les protéines impliquées dans la biosynthèse du LPS ne possèdent pas de SNP suggérant une stabilité de ces protéines et donc leur importance pour la bactérie. Mais ce qu'il est important à signaler c'est que les isolats collectés lors du dernier cycle de coqueluche se différencient bien des autres isolats (Hegerle et al, en préparation).

Au niveau transcriptomique

La PCR en temps réel quantitative a été utilisée pour analyser l'expression des gènes codant les facteurs de virulence majeurs de *B. pertussis*. Les expressions des facteurs de virulence par des isolats de l'ère pré-vaccinale ou post-vaccinale Ca ont été analysées. Il s'avère que ces expressions sont inférieures chez les isolats circulant actuellement mais ceci n'induit pas une différence de virulence (ci-dessous).

Au niveau de la production des déterminants de virulence :

Il s'avère que quelques isolats cliniques, collectés depuis 2005 en France, n'expriment plus soit la PT, soit la PRN et la FHA, soit la PRN ce qui va dans le sens de l'hypothèse formulée précédemment.

L'isolat n'exprimant pas de PT n'a pas provoqué d'hyperlymphocytose chez le petit patient. Par ailleurs, il n'est pas apte à induire une infection létale dans le modèle murin. La non-expression de la PT est due à une délétion de tous les gènes codant les sous-unités de la toxine.

Les isolats n'exprimant pas PRN, ont une pathogénicité semblable aux isolats exprimant la PRN dans le modèle murin. La cause génétique de la non-expression de la PRN est due, soit à la délétion du gène, soit à la délétion de plusieurs nucléotides, soit à des mutations soit à des additions ou délétions de nucléotides soit, et principalement, à l'intégration d'une IS dans

le gène. **Ceci est un résultat important car cela signifie qu'il ne s'agit pas d'un clone émergent mais qu'il s'agit bien de la fluidité du chromosome de *B. pertussis*. Seule la proportion des isolats n'exprimant la PRN a augmenté depuis 2005. Cette proportion est stationnaire depuis 2012 et atteint 15% des isolats collectés en 2013 (Ref 11). Il va être important de poursuivre cette surveillance car ces isolats pourraient avoir un rôle sur une modification de la durée de protection induite par les Ca.**

En ce qui concerne l'analyse temporelle du LPS produit par les souches vaccinales et les isolats cliniques, aucune différence n'a pu être mise en évidence (Ref 8), **confirmant ainsi les données de génomique.**

Au niveau de la cytotoxicité dans un modèle cellulaire

Nous avons précédemment montré que l'AC-Hly était la toxine responsable de l'apoptose des macrophages alvéolaires *in vitro* et *in vivo*. Tous les isolats de *B. pertussis* exprimant et produisant l'AC-Hly sont cytotoxiques. Nous avons pu montrer que cette cytotoxicité était inhibée par des anti-AC-Hly spécifiques comme attendu mais aussi par des anti-PRN, suggérant une interaction entre l'AC-Hly et la PRN. Comme attendu la cytotoxicité des isolats ne produisant pas de PRN n'est pas inhibée. Nous avons pu observer aussi que ni les anti-PT ni les anti-FHA n'inhibaient cette cytotoxicité. Cela était attendu pour les anti-PT mais pas pour les anti-FHA car une interaction entre AC-Hly et FHA avait été montrée précédemment. Cependant, la cytotoxicité des isolats collectés lors du cycle de coqueluche de 2012-2013 est, elle, inhibée par les anti-FHA, que les isolats produisent ou non la PRN. Ceci est un deuxième argument après celui du séquençage du génome de ces isolats pour dire qu'ils sont différents de ceux qui circulaient auparavant (Ref 14). Ces résultats corrélaient avec ceux que nous avons obtenus *in vivo* sur les nourrissons (Ref 4). En effet, nous avons montré que les symptômes cliniques (toux nocturne, toux paroxystique, chant du coq, fièvre, perte de poids, apnée, cyanose, vomissements, bradychardie, hyperlymphocytose, coqueluche maligne) de nourrissons, âgés de moins de 6 mois, infectés par des isolats produisant ou ne produisant pas la PRN ne présentent pas de différence significative. La seule différence significative est l'intervalle de temps entre le début de la toux et l'hospitalisation suggérant une plus faible virulence des isolats PRN-. Mais il est important de noter que la vaccination était associée avec des symptômes moins sévères dans les deux groupes (Ref 4).

Au niveau de la pathogénicité dans des modèles cellulaire ou animal

Les isolats de l'ère pré- ou post-Ce ou post-Ca ont une virulence semblable dans le modèle murin d'infection respiratoire.

Caractéristiques de la population de *B. parapertussis*

Au niveau de la bactérie

L'analyse des isolats de *B. parapertussis* a été réalisée de façon similaire. Le polymorphisme est très restreint jusqu'en 2007 où une augmentation du nombre d'isolats a été observée. Ces derniers isolats peuvent être différenciés des isolats circulant auparavant par ECP.

Au niveau de l'expression des facteurs de virulence

95 % de ces isolats circulant depuis 2007 n'expriment pas la PRN ! Cela est dû, soit à une délétion d'une paire de base dans le gène codant la PRN, soit un A dans la région répétée I de la PRN, soit un G dans la région répétée II du gène soit à une délétion de plusieurs nucléotides. Là encore il ne s'agit donc pas d'un seul clone.

Il est à noter que des isolats semblables ont été collectés en Espagne mais pas à St Petersburg, ville où le vaccin Ce est toujours utilisé, ce qui suggère fortement une influence de l'immunité vaccinale.

L'ensemble de nos données suggèrent que si l'immunité induite par le vaccin Ce n'a pas d'influence sur l'incidence des infections à *B. parapertussis*, l'immunité induite par les vaccins Ca en a peut-être une. La surveillance de ces infections doit continuer (Ref. 11).

6.3.2 Comment évolue la population de *Bordetella pertussis* au cours du temps dans d'autres pays ayant des stratégies vaccinales différentes ?

Dans le cadre de notre réseau européen EUpertstrain nous avons initié une collaboration avec nos collègues finlandais. Ils ont comparé leurs isolats avec les isolats français depuis 2005, année où le vaccin acellulaire a été introduit en Finlande. Il s'avère que des isolats n'exprimant pas la PRN ont été détectés en 2012 mais pas avant, c'est-à-dire 6 ans après l'introduction du vaccin. Les données pour 2013 indiquent qu'il n'y a pas une augmentation de ces isolats dont la proportion est inférieure à celle des isolats circulant en France.

Par ailleurs, nous avons poursuivi nos travaux dans le cadre du réseau EUpertstrain avec nos collègues européens. **Ces travaux montrent qu'au niveau génomique les**

isolats circulant en Europe sont très semblables mais qu'ils sont différents de ceux circulant il y a 10 ans (Ref. 2).

Nous avons aussi initié une collaboration avec nos collègues australiens. Il s'avère que des isolats qui n'expriment pas la PRN circulent aussi dans ce pays qui utilisent un vaccin Ca depuis une dizaine d'années (Ref 15).

6.3.3 Quelle est l'épidémiologie de la coqueluche à Bucarest ?

L'incidence de la coqueluche en Roumanie est largement sous-estimée comme dans beaucoup de pays dans le monde par manque de surveillance active. Une étude a été réalisée sur un an à Bucarest et la région alentour afin d'analyser la circulation de *B. pertussis* (Ref 16) .

Cinquante et un sujets suspects de coqueluche ont été enrôlés. La culture, la PCR-TR et la recherche d'anticorps anti-toxine de pertussis avec la technique de référence ont été utilisés comme diagnostic biologique. La coqueluche a été confirmée chez des patients de tous âges (63%), la plupart non ou incomplètement vaccinés. Le matériel génétique de *B. holmesii* a été détecté chez 22% des patients ! Ces patients étaient des adolescents et adultes comme en France et aux Etats-Unis mais à notre grande surprise aussi chez des jeunes enfants !

Les isolats de *B. pertussis* collectés étaient semblables à ceux circulant en Europe (Ref 16). Un des douze isolats collectés n'exprimait pas la pertactine.

L'ensemble de ces résultats confirment la circulation de *B. pertussis* en Roumanie, où l'incidence de la maladie est très sous-estimée. Elle confirme aussi l'importance de l'utilisation de diagnostics biologiques. Le problème pour ce pays est l'obtention de réactifs pour réaliser des diagnostics biologiques, en particulier la PCR-TR, à un coût raisonnable.

Notre étude confirme aussi que les vaccins ne sont pas toujours administrés comme recommandés par l'OMS et les autorités de santé locales.

6.4 Communications nationales (toutes sur invitation)

1. **Guiso N.** : Réunion annuelle des pneumologues de langue française – « Actualités sur la coqueluche en 2013 » Lille du 1^{er} au 1^{er} février 2013
2. **Guiso N.** : 14eme Journées Nationales d'Infectiologie, Session de communications orales thématiques : "Vaccinations et maladies à prévention vaccinale » Actualité de la vaccination coquelucheuse » Clermont-Ferrand le 12

juin 2013

3. **Guiso N.** : Journée Parisienne de Pédiatrie. « Diagnostic biologique des infections à Bordetelles : autour d'un cas et à visée épidémiologique » Paris le 4 octobre 2013
4. **Guiso N.** : 9^{ème} congrès Francophone Pédiatrique de Pneumologie et d'Allergologie « Actualités sur la coqueluche en 2013 » Paris le 15-11-2013
5. **Guiso N.** : 6^{ème} séminaire des CNR « Coqueluche : conséquences sur l'épidémiologie de la maladie de l'émergence d'isolats n'exprimant plus un ou plusieurs antigènes vaccinaux ? » Paris le 28 Novembre 2013

6.5 Communications internationales (toutes sur invitation)

1. **Guiso N.** Conférence « Pertussis : current strategy of prevention, diagnostics, and surveillance». St Pétersbourg- Russie 8-10 avril 2013
2. **Guiso N.** 31st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases – ESPID 2013 - “2006-2012: Follow-up of Pertussis paediatric surveillance, in private practice, in France” Milan, Italie, 25 mai au 1er juin 2013
3. **Guiso N.** EU-Pertgenomics/EUPERTstrain conference–Modérateur-Varsovie-Pologne du 5 au 7 juin 2013
4. **Guillot S.**, Bouchez B., **Guiso N.** – EU-Pertgenomics/EUPERTstrain conference « Novelties from *Bordetella holmesii* isolates collected in France » Varsovie-Pologne du 5 au 7 juin 2013
5. Hegerle N., **Guiso N.** - EU-Pertgenomics/EUPERTstrain conference “Evolution of *Bordetella pertussis* population: What can be learnt after a decade of acellular pertussis vaccination in France?” Varsovie-Pologne du 5 au 7 juin 2013
6. **Guiso N.** -10th International Symposium on Bordetella- “Human *Bordetella* planet: latest updates” : Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013

7. Hegerle N., **Guiso N.** -10th International Symposium on Bordetella- “In-vitro inhibition of *Bordetella pertussis* induced macrophage apoptosis”: Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013
8. Wirsing von König C.H., **Guiso N.**, Riffelmann M. -10th International Symposium on Bordetella- « Biological diagnosis of *Bordetella* infections“ Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013
9. Strati F., **Guillot S.**, **Guiso N.**, Bouchez V. -10th International Symposium on Bordetella- “Temporal analysis of the expression of *ptxA* by *Bordetella pertussis* isolates belonging to different vaccine era” Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013
10. **Guillot S.**, **Guiso N.** -10th International Symposium on Bordetella- “External quality controls of real-time PCR *Bordetella* diagnosis held in 2010 and 2012 in laboratories involved in Bordetellosis surveillance in France” Dublin, Irlande, du 8 au 11 septembre 2013
11. **Guillot S.**, Brun D., Doré G., Njamkepo E., Le Coustumier A. and **Guiso N.** - 10th International Symposium on Bordetella- « Evolution of *Bordetella bronchiseptica* in its host ». Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013
12. **Guiso N.** Symposium pour l’anniversaire des 150 ans de la naissance du Professeur Jean Cantacuzène, fondateur de l’Institut Cantacuzène, « **Maladies à prévention vaccinale** » Roumanie, Bucarest du 20 au 22 novembre 2013

6.6 Publication nationale

1. **GUISO N.** La coqueluche : physiopathologie, diagnostic et prévention (2013) **EMC-Maladies Infectieuses Vol. 10: (1) 8-017-B-10**

6.7 Publications internationales

2. ADVANI R., HALLANDER H., DALBY T., KROGFELT K., **GUIISO N.**, NJAMKEPO E., WIRSING VON KÖENIG C H., RIFFELMANN M., MOOI F., SANDVEN P., LUTYŃSKA A., FRY N., MERTSOLA J., HE Q. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Europe in 1998 to 2009 (2013) **J. Clin. Microbiol.** 51(2): 422-428
3. TIZOLOVA A., **GUIISO N.**, **GUILLOT S.** Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for biological diagnosis of pertussis syndrome (2013) **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 32(1) 89-96
4. BODILIS H., **GUIISO N.** Clinical symptoms in infants less than 6 months old infected by *Bordetella pertussis* isolates expressing or not expressing pertactin. **Emerg. Infect. Dis.** 19(3) 471-474
5. HEGERLE N., RAYAT L., **DORE G.**, ZIDANE N., BEDOUELLE H., **GUIISO N.** In-vitro and in-vivo analysis of the production of the *Bordetella* type three secretion system effector A in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Microbes Infect.** 2013 May; 15(5):399-408.
6. **GUIISO N.** How to fight pertussis? **Ther. Adv. Vaccines** (2013) 1 (2) : 59-66
7. BOUCHEZ V., **GUIISO N.** *Bordetella holmesii*: comparison of two isolates from blood and a respiratory sample. **Adv. Infect. Dis.** (2013) 3(2): 123-133
8. ALBITAR-NEHME S., BASHEER S.M., NJAMKEPO E., BRISSON J.R., **GUIISO N.**, CAROFF M. Comparison of Lipopolysaccharide structures of *Bordetella pertussis* clinical isolates from pre-and-post-vaccine era. **Carbohydrate research** (2013) 378:56-62
9. NGUYEN L.B., EPELBOIN L., GABARRE J., LESCO M., **GUILLOT S.**, BRICAIRE F., CAUMES E., **GUIISO N.** Recurrent *Bordetella holmesii* bacteremia and nasal carriage in a patient receiving rituximab. **Emerg. Inf. Dis.** (2013) 19(10): 1703-1705
10. **GUIISO N.** *Bordetella holmesii* and pertussis diagnosis: authors' reply **Pathology** (2013) 45(5): 531-5321

11. HEGERLE N., **GUIISO N.** Epidemiology of whooping cough and typing of *Bordetella pertussis*. **Future Microbiology** (2013).

2014

12. **GUIISO N.** *Bordetella pertussis*: Why is it still circulating? **J. of Infection** (2014) 68, S119eS124
13. TIZOLOVA A., **GUIISO N.**, **GUILLOT S.** "Development of Real-Time PCR for Detection of *Bordetella bronchiseptica* Reveals New Differences Between *B. bronchiseptica* Isolates and Allows Specific Molecular Diagnostic Assay for *Bordetella parapertussis*". **Diag. Microbiol. and Infect. Dis.** (2014) DOI10.1002/jobm.201300686.
14. HEGERLE N., **GUIISO N.** Changes in the circulating *Bordetella pertussis* population modifies antibody inhibition of macrophage apoptosis. **Microbiology** (2014). Sous Presse
15. RUITING L., **GUIISO N.** Multiple independent emergence and rapid expansion of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Australia" **EID** (2014). Sous Presse
16. DINU S., **GUILLOT S.**, DRAGOMIRESCU C.S., BRUN D., LAZAR S., VANCEA G., IONESCU B.M., GHERMAN M.F., BJERKESTRAND A.F., UNGUREANU V., **GUIISO N.**, DAMIAN M. "Whooping cough in South-East of 1 Romania-a one year study". **Diag. Microbiol. and Infect. Dis.** (2014)

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE

NA

Annexe 1 : Missions et Organisation du CNR

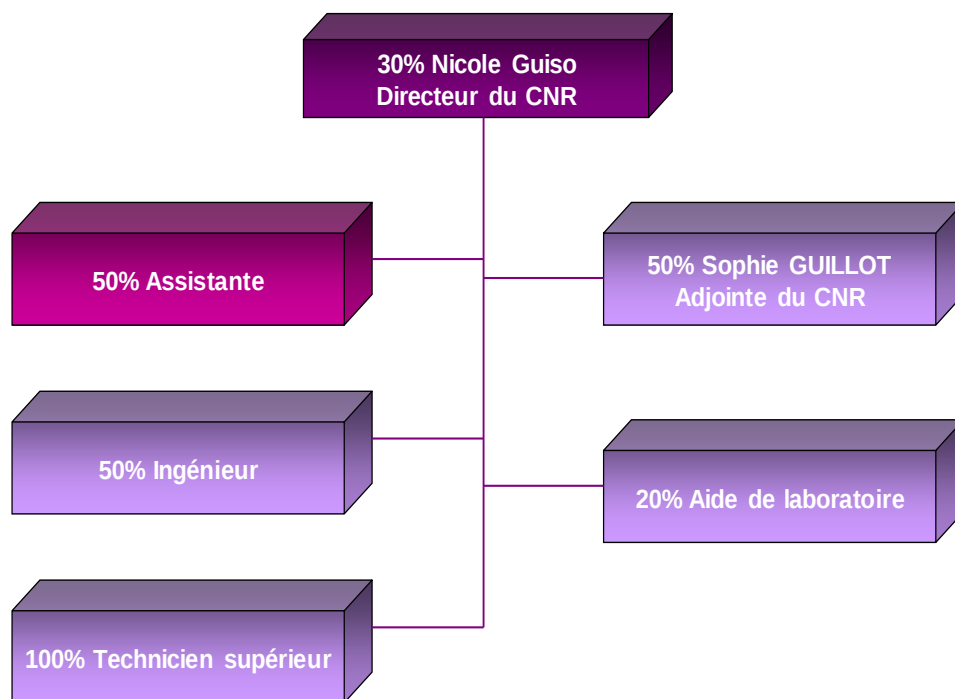
1.1 MISSIONS

- Assurer une expertise microbiologique :
 - Poursuivre le développement de tests de détection rapide et/ou d'outils de diagnostic tardif de la coqueluche,
 - Vérifier la couverture des isolats de *B. pertussis* et d'autres *Bordetella* circulants par les différents vaccins commercialisés en France,
 - Contribuer à la diffusion des techniques de diagnostics appropriées et à la validation des performances des tests utilisés par les laboratoires de bactériologie,
 - Mettre en œuvre des collaborations avec des laboratoires experts des bordetelloses animales
- Contribuer à la surveillance épidémiologique, el lien avec l'InVS :
 - En suivant la circulation des souches de *Bordetella* en France et en différenciant les souches de *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* et autres espèces du genre *Bordetella*,
 - En suivant l'évolution des souches n'exprimant pas certains antigènes vaccinaux,
 - En comparant les souches avec les isolats collectés en Europe
 - En contribuant à la surveillance des *B. pertussis*, *B. parapertussis* par l'animation du volet biologique du réseau RENACOQ,
 - En contribuant, le cas échéant, à la mise en place de nouvelles modalités de surveillance de la coqueluche en population générale
- Contribuer à l'alerte en signalant à l'InVS tout événement inhabituel
- Conseil :
 - Contribuer à l'évaluation du programme de vaccination contre la coqueluche et à l'évaluation de l'efficacité des vaccins acellulaires

1.2 EQUIPE

La composition de l'équipe du CNR et la qualification de chacun de ses membres sont représentées sur l'organigramme de la Figure 1. Ce CNR fait partie de l'unité de recherche PTMMH qui comprend aussi le CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*, et une équipe de recherche avec un chef de laboratoire Institut Pasteur, un directeur de recherche au CNRS, un ingénieur, un technicien supérieur, un stagiaire post-doctoral, trois étudiants en thèse et des stagiaires du réseau international des Instituts Pasteur.

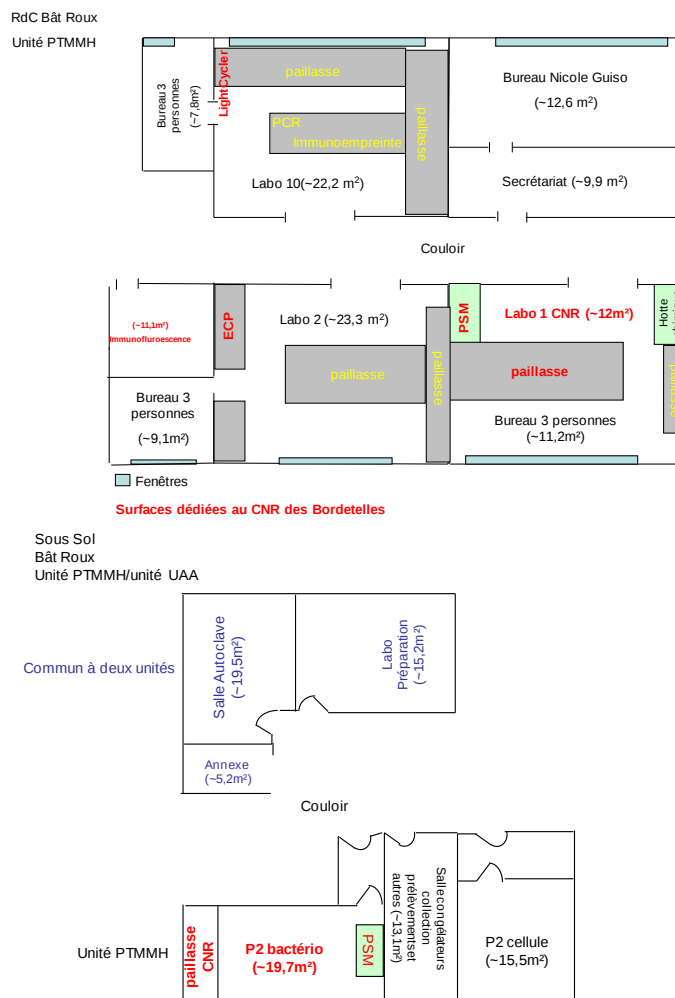
Figure 7 : Organigramme



1.3 LOCAUX

L'ensemble des missions du CNR est réalisé à l'Institut Pasteur dans les locaux qui sont représentés en Figure 8.

Figure 8 : Plan de l'unité de recherche Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines



1.4 DEMARCHE QUALITE

Figure 9 : Politique qualité de l'Unité de Recherche « Prévention et Thérapie Moléculaire des Maladies Humaines » et du CNR de la coqueluche et autres bordetelloses

La politique qualité de l'Unité PTMMH est de répondre toujours mieux :

- ▶ à ses missions de Centre national de Référence et d'Unité de recherche
- ▶ aux attentes de ses correspondants : Autorités nationales de santé, Organismes internationaux, Cliniciens et Médecins, Industriels, Partenaires scientifiques.

Pour cela, l'unité a développé, depuis plusieurs années, un système de gestion de la qualité visant à accroître l'efficacité de ses fonctionnements et à garantir des résultats justes, reproductibles et transmis dans les délais.

Dans cette dynamique, voici les objectifs de l'unité pour 2013 :

- Les changements réguliers au sein de l'équipe ainsi que l'évolution des techniques nous incitent, plus que jamais, à assurer le maintien des compétences et la transmission des savoirs au sein de l'unité. Sur ce point, l'unité sera donc particulièrement vigilante :
 - à ce que chaque technique de l'unité soit partagée par au moins deux personnes. Ce transfert de savoir et de savoir-faire se fera notamment par le biais des habilitations et de la formation ;
 - au renforcement des contrôles visant à assurer le maintien des compétences et à éviter les dérives dans la réalisation des techniques.
- Nous porterons également nos efforts sur l'optimisation des performances (en termes de sensibilité et de spécificité) de nos techniques de PCR en temps réel et sur la mise au point de nouvelles techniques de PCR temps réel, d'analyses et comparaison de séquences génomiques, de transcriptomique et de protéomique.
- Dans le cadre de ses missions de Centre National de Référence, l'unité cherchera à optimiser ses délais de caractérisation des isolats et de saisie des caractéristiques dans le système informatique LAGON. Ceci, dans le but de faciliter et de rendre plus efficace l'exploitation informatique ultérieure de ces informations, lors de la surveillance ou des expertises. Pour cela, chacun cherchera à optimiser l'organisation de son temps de travail via une planification plus efficace des manipulations et des saisies et à une meilleure prise en compte du risque de surcharge imprévue tel que les épidémies ou les cas en collectivité, en prévoyant notamment d'avantage de marges.
- Enfin, les chercheurs et techniciens de l'unité porteront une attention particulière à la planification des expériences et au pilotage des projets via l'élaboration de protocoles d'expériences décrivant les objectifs du projet, les moyens et les techniques à mettre en oeuvre pour les atteindre, les résultats attendus et les risques de ne pas aboutir comme prévu (identification et prise en compte des freins probables).
- Dans le cadre de la politique qualité du CNR l'unité s'est engagé dans la démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189 en déposant un dossier de validation de méthode de la technique de diagnostic moléculaire par PCR-TR de la coqueluche. L'audit COFRAC aura lieu au second semestre 2013.

En tant que Responsable de l'unité, je m'engage :

- à garantir de bonnes pratiques professionnelles,
- à assurer la qualité de nos prestations au service de nos correspondants,
- à poursuivre la mise en place d'un système de gestion de la qualité qui réponde aux prescriptions de la norme ISO/CEI 15189.

Et j'invite l'ensemble du personnel à veiller au respect des politiques et des procédures dans la réalisation de ses travaux.

Nicole Guiso, Responsable de l'Unité
Actualisation le 2 février 2013

Historique :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 des LRE de l'Institut Pasteur :

➤ **Bilan des actions réalisées en 2013 :**

Paris/Lyon :

- Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie)
- Formations : WebCampus, Manuel Qualité LREMS et Kalilab
- Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR Virus *Influenzae* et CNR Rage)
- Revue de direction LREMS
- Inclusion de la vague 2 (CNR Hantavirus, CNR FHV, CNR *Listeria* et CNR Méningocoques) dans la démarche d'accréditation ISO 15189

Guyane :

- Dépôt de la demande d'accréditation au COFRAC
- Organisation en multi-site (4 LRE et LABM)
- Missions d'accompagnement sur site (service QEDD et prestataire)
- Audits qualité internes ISO 15189 (technique et organisation)
- Définition des besoins pour la gestion des équipements et des paramètres environnementaux critiques

▪ **Evènements d'importance 2014 :**

Paris :

- Accréditation ISO 15189 du LREMS (CIBU, CNR Leptospirose, **CNR coqueluche et autres bordetelloses**, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR Virus *Influenzae* et CNR Rage) par le COFRAC

Guyane :

- Audit initial d'accréditation ISO 15189 du Laboratoire associé au CNR des Arbovirus

➤ **Perspectives 2014 :**

- Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars 2014
- Revue de direction LREMS : 8 Avril 2014
- Poursuite du groupe de travail technique pour les validation de méthode : Juin et octobre 2013
- Finalisation dossiers de validation de méthode (1^{ère} et 2^{ème} vagues) : Juin 2014
- Audit de suivi ISO 15189 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : Novembre/décembre 2014

Participation à un contrôle qualité externe :

En novembre 2013, nous avons participé à un contrôle qualité externe (QCMD) pour l'identification moléculaire de *Bordetella pertussis*. Le QCMD se composait de 12 échantillons à partir desquels il fallait détecter la présence ou non du matériel génétique de bactéries du genre *Bordetella* et dans un deuxième temps identifier l'espèce *pertussis* par typage moléculaire. La première étape a consisté à purifier l'ADN des 12 échantillons. Nous avons ensuite fait les PCR-TR qui ciblent l'IS481 et l'IS1001 (PCR très sensibles mais pas spécifiques d'une espèce donnée) et effectué une analyse qualitative. Nous avons obtenu 100% de réussite pour l'identification du genre *Bordetella*.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué le typage moléculaire par PCR-TR en utilisant différentes cibles spécifiques d'espèce (ptxA-Pr, h-IS1001, BP3385 et Fla). Nous avons obtenu 100% de réussite pour l'identification de l'espèce *Bordetella pertussis* et des autres espèces de *Bordetella* ciblées.

ANNEXE 2 : Capacités Techniques du CNR

2.1 IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES BACTERIES DU GENRE *BORDETELLA*

- L'ensemble des données concernant les isolats cliniques reçus au laboratoire est géré informatiquement par le logiciel Lagon (EpiConcept) ;
- Les techniques d'identification et de caractérisation des bactéries, réalisées au CNR, sont les techniques de bactériologie classique ;
- La sensibilité aux antibiotiques de tous les isolats cliniques envoyés ou isolés au CNR (ampicilline, la céfalexine, la streptomycine, l'érythromycine, l'azithromycine, la clarithromycine, le triméthoprim et le sulfaméthoxazole) est testée ;
- La production des déterminants de virulence est vérifiée :
 - avec des anticorps monoclonaux spécifiques, par agglutination et/ou immunofluorescence pour les protéines fimbriales ;
 - par visualisation de l'hémolyse et le dosage de l'activité adényl cyclase pour la toxine adényl cyclase-hémolysine ;
 - avec des anticorps polyclonaux spécifiques, par immuno-empreinte, pour la toxine de pertussis, l'hémagglutinine filamenteuse et la pertactine ;
- Le typage et la classification des isolats se fait avec la technique d'électrophorèse en champs pulsés (ECP). Les profils de restriction des isolats obtenus sont ensuite comparés à ceux des souches de référence et des souches vaccinales à l'aide du logiciel Bionumerics (AppliedMaths) ;
- Enfin, tous les isolats reçus ou isolés et identifiés sont ensuite introduits en triple dans la collection après analyse et sauvegarde de leurs caractères moléculaires dans le logiciel Bionumerics ;
- ***Dans le cas où un isolat appartenant au genre Bordetella présente des caractères différents de ceux généralement décrits, l'unité de recherche teste ses propriétés dans le modèle murin d'infection intranasale, analyse ses interactions avec les macrophages ou les cellules épithéliales, et effectue la séquence partielle ou entière des gènes de structure de certaines toxines et adhésines voire la séquence totale du génome des isolats ;***
- Dans le cas où l'identification de l'isolat est difficile, comme c'est le cas pour certaines espèces de bactéries du genre *Bordetella*, en raison du manque de caractères biochimiques ou de caractères inhabituels, nous réalisons la séquence de l'ADNr 16S.

Le séquençage de l'ADN génomique qui est nécessaire pour permettre l'identification des isolats est réalisé par la plate-forme de Génomique des pathogènes et Santé Publique (PF8) située à l'Institut Pasteur.

2.2. CONSTITUTION D'UNE COLLECTION

Notre collection de bactéries du genre *Bordetella* regroupe actuellement plus de 1800 isolats. Nous avons poursuivi la saisie des nouveaux isolats dans l'application informatique Lagon. Tous ces isolats sont classés et conservés en triple dans deux congélateurs à -80°C différents, sous alarme, ainsi que dans une cuve sous azote. Les isolats de référence ont aussi été déposés au Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRB-IP) et à la collection suédoise de Göteborg.

La durée de conservation des isolats est testée régulièrement. Elle est au moins de 10 ans en milieu BSA-SPG à -80°C.

2.3 LISTE DES DIAGNOSTICS BIOLOGIQUES UTILISES ET RECOMMANDES PAR LE CNR POUR LA SURVEILLANCE DES BORDETELLOSES

- **Culture** : la culture est recommandée dans tous les cas pour les patients soit nouveau-nés non vaccinés ou incomplètement vaccinés soit enfants, adolescents ou adultes non vaccinés ou dont le délai depuis la dernière vaccination est supérieur à 5 ans. Elle est recommandée pendant la période catarrhale, c'est-à-dire la phase atypique d'une personne ayant été en contact avec un cas confirmé biologiquement dans les 21 jours qui suivent le début de la toux de ce cas et pour tous les patients symptomatiques dans les deux premières semaines de la phase d'état. **Ce diagnostic est très important** car d'une part, il est le seul à être 100 % spécifique et d'autre part, il permet d'analyser l'évolution de la population des Bordetelles et sa susceptibilité vis-à-vis des macrolides et du triméthoprim/sulfaméthoxazole.

- **PCR en temps réel** :

Les cinq diagnostics par PCR-TR réalisés sont ceux ayant comme cible :

- **L'IS481** qui permet la détection des espèces *pertussis* et *holmesii* mais aussi assez souvent *bronchiseptica* ;
- Le promoteur de la toxine de pertussis (**ptxA-Pr**) qui est spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'IS481 ;
- Le gène BP335 qui permet la détection de l'espèce *pertussis* et quelquefois l'espèce *B.*

bronchiseptica

- **L'IS1001** qui permet la détection de l'espèce *parapertussis* mais aussi quelquefois l'espèce *bronchiseptica* ;
- **L'h-IS1001** qui permet la détection spécifique de l'espèce *holmesii*

Le CNR échange des contrôles qualité (CQ) avec des laboratoires de microbiologie hospitaliers ainsi que des laboratoires de biologie médicale (LBM). La liste des laboratoires réalisant des contrôles qualité avec le CNR est indiquée sur le site web du CNR.

- **Sérologie** : Seul le dosage des anticorps anti-toxine de pertussis (anti-PT) est spécifique d'une infection ou d'une vaccination à *B. pertussis*. **Aucun test commercial n'a été validé.** La technique de référence est la technique ELISA, réalisée uniquement par les laboratoires de référence dans le monde et donc réalisée par le CNR. Ce test est utilisé par le CNR lors de cas groupés de coqueluche dans des collectivités. Les conditions d'utilisation de ce diagnostic sont précisées dans les recommandations (http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/hcspr20080905_coqueluche.pdf). Nous avons réalisé le CQ de l'ECDC avec cette technique mais nous testons actuellement trois kits commerciaux.