

BILAN DES ACTIVITES 2006-2010 ET DEMANDE DE RENOUVELLEMENT DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE POUR LA COQUELUCHE ET AUTRES BORDETELLOSES

2012-2016

**UNITE de Recherche Prévention et Thérapies Moléculaires des Maladies Humaines
Institut Pasteur**



Responsable : Nicole GUISO

Adjointe : Sophie GUILLOT

Elisabeth Njamkepo (50%)

Delphine Brun (50%)

Gregory Dore (50%)

Sommaire

A	<u>FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE</u>	7
B	<u>NOTE DE PRESENTATION ET DE MOTIVATION</u>	9
B.1	COURRIER OFFICIEL D'ACTE DE CANDIDATURE (INDIQUANT AGENT PATHOGENE OU THEMATIQUE CONCERNE)	9
B.2	POURQUOI FAUT-IL UN CNR DE LA COQUELUCHE ET AUTRES BORDETELLOSES ?	10
C	<u>DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE</u>	13
C.1	ORGANISATION PROPOSEE POUR REpondre AUX EXIGENCES FIXEES DANS LE CAHIER DES CHARGES	13
C.2	LES MOYENS DONT DISPOSE LE LABORATOIRE QUI SERAIENT AFFECTES AU CNR	13
C.2.1	EN MATIERE DE RESSOURCES HUMAINES	13
C.2.2	EN MATIERE D'EQUIPEMENTS ET DE LOGISTIQUE	16
C.3	BREF DESCRIPTIF DES THEMATIQUES DE RECHERCHE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR	18
C.4	CAPACITES TECHNIQUES ACTUELLES DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE SPECIFIQUE DU CNR	18
C.4.1	LISTE DES TECHNIQUES POUR LE DIAGNOSTIC/IDENTIFICATION, TYPAGE EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTI-INFECTIEUX	18
C.4.1.1	DIAGNOSTIC DIRECT DE LA COQUELUCHE	18
C.4.1.2	DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE INDIRECT	19
C.4.1.3	SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX	19
C.4.1.4	TECHNIQUE DE TYPAGE DES ISOLATS CLINIQUES	19
C.4.2	COLLECTIONS DE SOUCHES, ANTIGENES OU IMMUN-SERUMS DE REFERENCE DISPONIBLES	19
C.4.2.1	Description : nombre de souches, caractérisation	19
C.4.2.2	Conditions de stockage	19
C.4.2.3	Conditions de mise à disposition de ces collections	20
D	<u>BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2006-2010)</u>	22
D.1	LES ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE	22
D.1.1	NATURE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES ETUDIES	22
D.1.2	NOMBRE DE PRELEVEMENTS ET D'ISOLATS CLINIQUES DE BORDETELLA REÇUS EN 2010	22
D.1.3	NOMBRE DE PCR REALISEES	23
D.1.4	NOMBRE DE SEROLOGIES REALISEES	23

D.1.5	NOMBRE D'APPELS ET DE MESSAGES	24
D.1.6	DISTRIBUTION DES STANDARDS ET DIVERS PRODUITS BIOLOGIQUES	24
D.1.7	TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES (RENACOQ OU AUTRES)	24
D.2	CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE	25
D.2.1	SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION DE LA COQUELUCHE	25
D.2.2	BORDETELLOSES AUTRES QUE COQUELUCHE	26
D.2.2.1	Infections humaines à <i>B. bronchiseptica</i>	26
D.2.2.2	Autres bordetelloses humaines	27
D.3	CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS	27
D.3.1	EUROPE	27
D.3.2	INTERNATIONAL	27
D.4	ALERTE	27
D.5	ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	28
D.6	TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	28
D.6.1	INTRODUCTION ET RESUME DES TRAVAUX REALISES DE 1989 A 2006	28
D.6.2	RECHERCHES EFFECTUEES PAR LE CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DE 2006 A 2010	29
D.6.2.1	Polymorphisme et évolution spatio-temporelle des espèces de Bordetelles	29
D.6.2.2	Techniques de diagnostic des bordetelloses par PCR en temps réel	31
D.6.2.3	Etude Diamocoq	32
D.6.2.4	Organisation de contrôles qualité	32
D.6.2.5	Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des différents diagnostics biologiques de la coqueluche	32
D.6.2.6	Evaluation de la persistance du matériel génétique de <i>Bordetella pertussis</i> dans les aspirations nasopharyngées de nouveau-nés ayant la coqueluche suite à un traitement par macrolides	32
D.7	RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE, EN RELATION AVEC L'ACTIVITE DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE EN 2010	33
D.7.1	COMMENT EVOLUENT LES POPULATIONS DE <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> ET DE <i>BORDETELLA PARAPERTUSSIS</i> AU COURS DU TEMPS EN FRANCE ?	33
D.7.1.1	<i>B. pertussis</i>	33
D.7.1.2	<i>B. parapertussis</i>	34
D.7.2	COMMENT EVOLUENT LES POPULATIONS DE <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> ET DE <i>BORDETELLA PARAPERTUSSIS</i> DANS DES REGIONS N'AYANT PAS LA MEME STRATEGIE VACCINALE QUE LA FRANCE ?	34
D.7.3	LA POPULATION DE <i>BORDETELLA BRONCHISEPTICA</i> EST-ELLE HOMOGENE ?	35
D.7.4	COMMENT EVOLUE UNE BORDETELLE AU COURS D'UNE INFECTION PERSISTANTE CHEZ L'HOMME ? EX DE <i>BORDETELLA BRONCHISEPTICA</i>	36

D.7.5	QUELLE EST L'INCIDENCE DE LA COQUELUCHE CHEZ LES ADOLESCENTS ET LES ADULTES EN 2008 2009 DANS LA REGION PARISIENNE ?	36
D.7.6	QUELLE EST LA DUREE DE L'IMMUNITE INDUITE PAR LES VACCINS COQUELUCHEUX ?	37
D.7.7	QUELLE EST L'IMMUNITE DE LA POPULATION ADULTE VACCINEE SELON LES RECOMMANDATIONS FRANÇAISES CONTRE LE TETANOS, LA DIPHTERIE ET LA COQUELUCHE ?	38
D.7.8	DES SUJETS SANS HISTOIRE VACCINALE CONNUE INDUISENT-ILS UNE REPONSE APRES VACCINATION AVEC UN VACCIN DTPCA ?	38
D.7.9	PEUT-ON INDUIRE DES REPONSES HUMORALES CHEZ DES ENFANTS INFECTES PAR LE HIV	38
E	<u>LISTE DES PUBLICATIONS</u>	40
E.1	PUBLICATIONS NATIONALES	40
E.2	PUBLICATIONS INTERNATIONALES	42
E.3	COMMUNICATIONS NATIONALES (TOUTES SUR INVITATION)	45
E.4	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES (TOUTES SUR INVITATION)	48
E.5	ENSEIGNEMENTS DE JANVIER 2006 A DECEMBRE 2010	50
E.6	EXPERTISES	52
E.7	COLLABORATIONS	53
F	<u>DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU CNR</u>	55
G	<u>DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE</u>	58
H	<u>PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2012-2016</u>	62
H.1	PROJETS DE RECHERCHE DU CNR	62
H.1.1	LA COLLECTION D'ISOLATS CLINIQUES	62
H.1.2	L'ANALYSE DES ISOLATS DE <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> , <i>BORDETELLA PARAPERTUSSIS</i> , <i>BORDETELLA BRONCHISEPTICA</i> , <i>BORDETELLA HOLMESII</i> ET <i>BORDETELLA PETRII</i>	62
H.1.3	LE DEVELOPPEMENT D'OUTILS MOLECULAIRES POUR DIFFERENCIER LES ESPECES DE BORDETELLES	62
H.1.4	DIAGNOSTIC BIOLOGIQUES DES BORDETELLOSES	62
H.1.4.1	Analyse de la proportion d'infection à <i>Bordetella holmesii</i> parmi les bordetelloses diagnostiquées avec la technique de PCR en temps réel utilisée comme diagnostic biologique en France	63
H.1.4.2	Développement d'un outil biologique par PCR en temps réel des infections à <i>B. bronchiseptica</i>	63
H.1.4.3	Amélioration de la sensibilité de la PCR en temps réel	63
H.1.5	SURVEILLANCE DES BORDETELLOSES A <i>BORDETELLA PETRII</i>	63

H.2 PROJETS DE L'UNITE DE RECHERCHE	63
H.2.1 ANALYSE SPATIO TEMPORELLE DES ISOLATS DES ESPECES <i>PERTUSSIS</i> ET <i>PARAPERTUSSIS</i> ET DE LEURS ANTIGENES	63
H.2.2 ANALYSE DES ISOLATS DE L'ESPECE DE <i>B. HOLMESII</i>	64
H.2.3 ANALYSE DES ISOLATS DE L'ESPECE DE <i>B. BRONCHISEPTICA</i> INDUISANT DES INFECTIONS PERSISTANTES	64
H.2.4 ANALYSE DE LA DUREE DE L'IMMUNITE INDUITE PAR LES VACCINS ACELLULAIRES	65
H.2.5 DETERMINATION DE L'INCIDENCE DE LA COQUELUCHE CHEZ LES PLUS DE CINQUANTE ANS	65
<u>ANNEXE 1 : AFFICHE PRESENTEE LE 2 DECEMBRE A LA RICAI (PALAIS DES CONGRES, PARIS)</u>	<u>67</u>
<u>ANNEXE 2 : AFFICHE 370 PRESENTEE LE 2 DECEMBRE A LA RICAI (PALAIS DES CONGRES, PARIS)</u>	<u>68</u>

FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE

A FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE

L'unité de recherche Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines

Institut Pasteur
25 rue du Dr ROUX
75724 PARIS Cedex 15

Représentée par **Nicole GUISO** en tant que responsable scientifique

Téléphone : +33 (0)1 45 68 83 34 – Fax : +33 (0)1 40 61 35 33 – e-mail : nicole.guiso@pasteur.fr

Secondée par **Sophie GUILLOT** en tant qu'adjointe

Téléphone : +33 (0)1 40 61 32 92 - Fax : +33 (0)1 40 61 35 33 – e-mail : sophie.guillot@pasteur.fr

Représentée par **Christophe MAURIET** en tant que responsable administratif

Téléphone : +33 (0)1 45 68 80 10 – e-mail : christophe.mauriet@pasteur.fr

NOTE DE PRESENTATION ET DE MOTIVATION

B NOTE DE PRESENTATION ET DE MOTIVATION

B.1 Courrier officiel d'acte de candidature (indiquant Agent pathogène ou thématique concerné)

Depuis sa création en 1993 les recherches effectuées dans le cadre du Centre National de Référence (CNR) de la coqueluche et autres "bordetelloses" sont indissociables de celles effectuées dans le cadre de l'Unité de recherche des "Bordetella" de l'Institut Pasteur devenue, en 2004, l'Unité de « Prévention et Thérapies Moléculaires des Maladies Humaines » (PTMMH). Cette unité poursuit des recherches sur les conséquences de la vaccination intensive sur les micro-organismes ciblés par la vaccination, les populations humaines vaccinées et le développement d'outils thérapeutiques lorsque la prévention n'est pas possible.

Nous souhaitons poursuivre cette activité de surveillance qui a permis au cours des quinze dernières années, couplée à nos activités de recherche, d'améliorer les diagnostics biologiques de la maladie, base de la surveillance, mais surtout de montrer l'impact de la vaccination généralisée sur la modification des germes ciblés par les vaccins utilisés, qui sont de deux types dans le cas de la coqueluche.

La vaccinologie est une vraie science qui est évolutive, nous le savons maintenant, puisque nous avons 70 ans de recul par rapport à l'introduction généralisée de certains vaccins. Science évolutive en fonction des types de vaccins utilisés (tués, atténués vivants, sous-unitaires.....), des calendriers vaccinaux, des connaissances des populations humaines, du vieillissement de ces populations, de leur environnement, en particulier microbien, et de leur mode de vie. Il est maintenant bien démontré que toute introduction d'un vaccin dans une population, indépendamment de son impact très positif sur l'élimination ou le contrôle des maladies infectieuses, nécessite une surveillance épidémiologique et microbiologique continue. Pourquoi notre unité de recherche veut-elle continuer, en parallèle de ses recherches, à s'engager dans la surveillance de deux maladies à prévention vaccinale, la diphtérie et la coqueluche, que les populations de certains pays développés considèrent comme contrôlées ?

- *car les vaccins ciblant ces bactéries sont les plus anciens ;*
- *car les vaccins coquelucheux sont soit à germes entiers soit sous-unitaires et induisent donc une immunité différente ;*
- *car, dans le cas de la coqueluche, la stratégie vaccinale a permis la diminution de la mortalité et de la morbidité chez les jeunes enfants mais a modifié les caractéristiques de la maladie et en particulier sa transmission qui est maintenant d'adultes à nouveau-nés et non d'enfants à enfants ;*
- *car l'utilisation des deux types de vaccins a modifié l'écologie bactérienne et qu'il est donc important de surveiller maintenant l'émergence d'espèces nouvelles non ciblées par les vaccins ;*
- *car ces maladies peuvent être considérées comme des zoonoses ;*

- **car la population humaine des pays développés vieillit et par conséquent devient de plus en plus susceptible à ces maladies ou à de nouvelles.**

B.2 Pourquoi faut-il un CNR de la coqueluche et autres bordetelloses ?

Les bordetelles sont des bactéries Gram-négatif, responsables, pour la plupart, d'infections respiratoires. Ce sont des β -protéobactéries qui font partie du genre *Bordetella*. Elles sont, depuis peu, divisées en neuf espèces, deux infectant principalement les oiseaux ou volailles (*B. avium* et *B. hinzii*) ; deux infectant l'homme mais anecdotiquement à l'heure actuelle (*B. ansorpii* et *B. trematum*) et enfin cinq pouvant infecter l'homme de façon diverses. Ces dernières sont *B. pertussis* et *B. parapertussis*, agents de la coqueluche ; *B. holmesii* agent de bactériémies chez les sujets immunodéprimés, en particulier aspléniques, mais pouvant aussi provoquer un syndrome coqueluchoïde; *B. petrii*, bactérie de l'environnement mais pouvant aussi induire une infection respiratoire persistante chez l'homme et enfin *B. bronchiseptica* dont sont issues, *B. pertussis* et *B. parapertussis*, pouvant infecter plusieurs espèces de mammifères et induisant soit des bactériémies soit des infections respiratoires, comme *B. holmesii*, chez l'homme immunodéprimé.

Qu'en est-il de la nécessité d'un CNR « pour la coqueluche et autres bordetelloses ». La coqueluche, due à *B. pertussis*, est une maladie à prévention vaccinale depuis 1959. Le premier vaccin utilisé en France, le vaccin à germes entiers, a été efficace, bien toléré et la couverture vaccinale chez les jeunes enfants a toujours été élevée. L'incidence des infections humaines à *B. parapertussis* semble très faible et celle des infections à *B. holmesii* et *B. bronchiseptica* est inconnue et inquiète peu !

Voici les raisons pour lesquelles le renouvellement de ce CNR nous semble important :

1. La coqueluche causée par *B. pertussis* et *B. parapertussis* reste un problème de santé publique dans le monde, et cela en dépit de la généralisation de la vaccination dans les pays développés. **Quelles en sont les raisons précises ?**
2. Sans que toute la lumière soit faite sur les causes du manque de contrôle de la coqueluche dans les pays développés, vaccinés efficacement, la nature des vaccins est modifiée. En effet, le vaccin coquelucheux à germes entiers, utilisé depuis plus de 50 ans, a été remplacé récemment par des vaccins sous-unitaires dans beaucoup de ces pays. **Quel en sera l'impact sur l'immunité de la population et sa protection vis-à-vis des bordetelloses ?**
3. Les vaccins sous-unitaires utilisés maintenant présentent des compositions très différentes. **Quelles en seront les conséquences au niveau du type d'immunité induite et de la durée de cette immunité?**
4. Les expressions cliniques des bordetelloses sont variables et des diagnostics biologiques sont indispensables. Malgré le développement de plusieurs diagnostics moléculaires performants, il est encore nécessaire d'améliorer leur spécificité ;

5. La population de *B. pertussis* est très peu polymorphe. Cependant, elle évolue au cours du temps. *Est-ce dû uniquement à la vaccination ? uniquement à un type de vaccin particulier ? à un environnement particulier ?...*

Notre unité de recherche à l'Institut Pasteur poursuit, depuis une vingtaine d'années, **des travaux sur les interactions des Bordetelles avec l'hôte**, en collaboration étroite avec des cliniciens et des épidémiologistes. De plus, un modèle murin d'infection respiratoire et des modèles cellulaires sont utilisés pour la caractérisation, et la régulation de l'expression des facteurs impliqués dans la virulence de ces bactéries. Ces recherches sont entreprises afin de mieux comprendre la physiopathologie des infections à *Bordetella*, améliorer le vaccin contre la bordetellose humaine, la coqueluche, et mettre au point un vaccin contre les bordetelloses animales. Parallèlement, l'unité a entrepris, plus récemment, **des études sur l'évolution de la population de *B. pertussis* et *B. paraptussis* dans différentes régions du monde dont les stratégies vaccinales sont différentes.**

C'est pour l'ensemble des raisons exposées et des recherches que nous développons à l'Institut Pasteur que nous proposons que le CNR de "la coqueluche et autres bordetelloses" soit renouvelé et que nous souhaitons porter cette candidature.

DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE

C DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE

C.1 Organisation proposée pour répondre aux exigences fixées dans le cahier des charges

L'unité de recherche PTMMH assurera seule, les exigences prévues au cahier des charges.

C.2 Les moyens dont dispose le laboratoire qui seraient affectés au CNR

C.2.1 En matière de ressources humaines

- CURRICULUM VITAE

Nicole GUISO
13 mars 1951

Nationalité française
Veuve, 3 enfants

Formation Universitaire

Docteur ès sciences, 1980
Docteur de Troisième cycle, 1976
Certificat d'Immunologie Approfondie, Institut Pasteur 1973
Diplôme d'études approfondies (Immunologie) 1973
Maîtrise ès sciences (Biochimie) 1972
Licence ès sciences (Biochimie) 1971

Expérience professionnelle

Depuis 2008 :	Directrice du "Centre National de Référence des Corynebactéries toxigènes" Institut Pasteur
Depuis 2004 :	Chef de l'unité "Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines", Institut Pasteur
2002-2006 :	Directeur du Département "Ecosystèmes et Epidémiologie des Maladies Infectieuses", Institut Pasteur
2000-2003	Chef de l'Unité des <i>Bordetella</i> , Institut Pasteur
Depuis 1993 :	Directrice du "Centre National de Référence de la coqueluche et autres bordetelloses », Institut Pasteur
De 1995 à 1999 :	Responsable du "Laboratoire des <i>Bordetella</i> ", Institut Pasteur
Depuis 1991 :	Chef de laboratoire Institut Pasteur
1988-1991 :	Chargée de Recherche Institut Pasteur
1986-1987 :	"Visiting scientist" : National Jewish Hospital, Denver, Colorado, U.S.A.
1982-1985 :	Chargée de Recherche Institut Pasteur
1977-1981 :	Assistante Institut Pasteur
1975-1976 :	Boursière de la "Fondation Roux", Institut Pasteur
1972-1974 :	Stagiaire bénévole, Institut Pasteur

Autres activités

Colloques-Séminaires	Participation à nombreux colloques et séminaires, français et internationaux
Enseignements	Un nombre important de cours donnés à l'Institut Pasteur, en France et à l'étranger
Direction de recherches	9 thèses (5-6 ans), 12 post-docs, 37 stagiaires (3-7 mois)
Comités scientifiques	Invitée à titre d'expert sur la coqueluche par différents organismes en France et à l'étranger : groupes de travail du Comité Technique des Vaccinations français, InVS, AFSSA, Autorités de santé de différents pays, groupe de travail du comité SAGE de l'OMS ; Membre Elu de l'Assemblée des Cents (1996-2004) ; Membre de la Commission Centrale d'animalerie de l'Institut Pasteur (1990-2004) ; Présidente du Comité des Nouveaux Programmes concernant le Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts Associés : CNPRI (2000-2001) Coordinatrice du groupe de perspectives de l'Institut Pasteur "Epidémiologie –Santé Publique" (2000) ; Membre du Comité scientifique du Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts Associés (1998-1999) ; Membre de la Commission de Classement de l'Institut Pasteur à Paris (1982-1986 ; 1993-1996) ; Membre des Jury de Qualification de l'Institut Pasteur à Paris (1982-1986 ; 1988-1992 ; 1994-1997) ; Membre du Conseil scientifique de l'Institut Pasteur à Paris (1999-2002) ; Membre des comités scientifiques des Instituts Pasteur d'Iran, de Tunisie et de l'Institut Cantacuzène de Roumanie.

Distinctions

Grade de Chevalier de la Légion d'Honneur, 2006
Grade de Chevalier dans l'Ordre National du Mérite, 2001.
Lauréate du "Prix du Docteur Darolles" de l'Académie de Médecine, 1998
Prix de la Société Française de Chimie, 1984
Lauréate du "Prix Nicloux" de la Société Française de Chimie, 1984

Sociétés Savantes

Membre : Société Française de Microbiologie (SFM) et American Society for Microbiology (ASM)
Membre : European Society for Paediatric Infectious Diseases et European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Publications

138 publications et 106 revues avec comité de lecture

GUILLOT Sophie
03-07-1960

Nationalité française
Célibataire

Formation universitaire

Diplôme de l'École Pratique des Hautes Etudes - La Sorbonne - 1995
Diplôme de Génie Génétique Paris VII - 1990
Diplôme Universitaire de Technologie (analyses biochimiques) Paris XII -1981

Expérience professionnelle

Depuis nov.2009 Responsable Adjoint du « Centre National de Référence de la coqueluche et autres bordetelloses » Institut Pasteur
2004-2006 Responsable Adjoint du Centre Collaborateur de l'OMS des "Entérovirus et Vaccins Viraux", Institut Pasteur
Depuis 2004 Ingénieur de Recherche dans l'Unité de « Prévention et Thérapie moléculaire des Maladies Humaines », Institut Pasteur
2001-2003 Ingénieur de Recherche à Institut Pasteur dans le Laboratoire des Entérovirus », Institut Pasteur
1987-2000 Tech. Sup. de Laboratoire dans l'unité de « Virologie Médicale », renommée "Laboratoire des Entérovirus" à partir de 1994, Institut Pasteur
1982-1986 Tech. Sup. de laboratoire dans le laboratoire de Contrôle de Pasteur Vaccins à Val de Reuil 27)

Autres activités

Encadrement technique

Etudiants (niveau M1/2) et de nombreux stagiaires du Réseau International de l'Institut Pasteur (RIIP)

Enseignement

Participation à l'organisation et encadrement des étudiants du cours de virologie fondamentale en 2005 et du cours de virologie médicale en 2006, au centre d'enseignement de l'Institut Pasteur.

Organisation du cours international de phylogénie moléculaire (groupe Entérovirus, Bucarest), 2003.

Responsable d'un atelier pratique organisé à l'Institut Pasteur de Tunis en 1995 et 2001.

Responsable d'un TP au Cours de Virologie Médicale en 1992, 1995 et 1996. Institut Pasteur

Responsable de l'atelier polio du cours de biologie moléculaire organisé par la délégation générale du RIIP, à Ho Chi Min Ville (Vietnam) en 1996.

Comité d'Évaluation scientifique

Membre de la Commission d'évaluation du personnel scientifique de l'Institut Pasteur de 2006 à 2010

Réunions scientifiques

Participation à des réunions scientifiques en France et à l'étranger

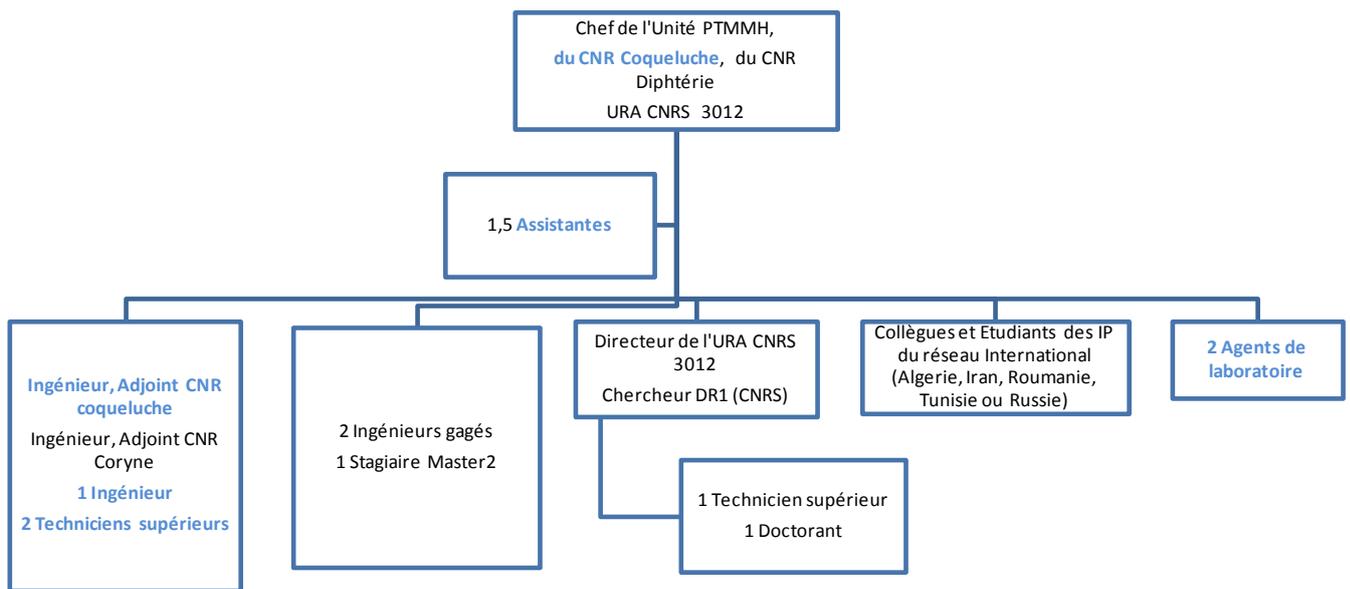
Publications

27 publications

- **Etat des emplois rémunérés**

- d'un chef d'unité, **Nicole Guiso responsable du CNR (CV ci-dessus)** ; (0.30 ETP)
- responsable adjoint du CNR **Sophie Guillot (CV ci-dessus)** (0.50 ETP)
- technicien de laboratoire **Grégory Doré** (0.50 ETP)
- technicien de laboratoire **Delphine Brun** (0.50 ETP)
- Secrétariat **Laurence Langlais** (0.50 ETP)
- Laboratoire de préparation **Elsa Simoneau** (0.10 ETP) et **Huu Huan N'Guyen** (0.10 ETP)

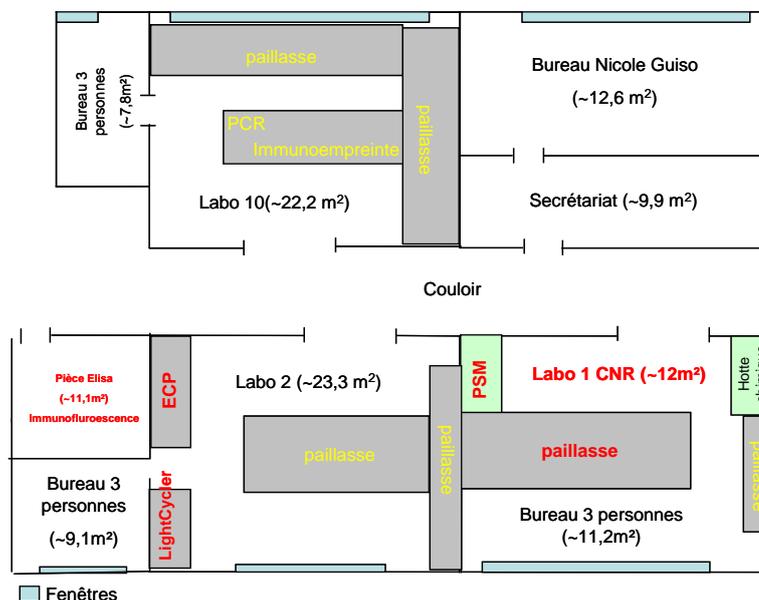
- **Organigramme de l'unité**



C.2.2 En matière d'équipements et de logistique

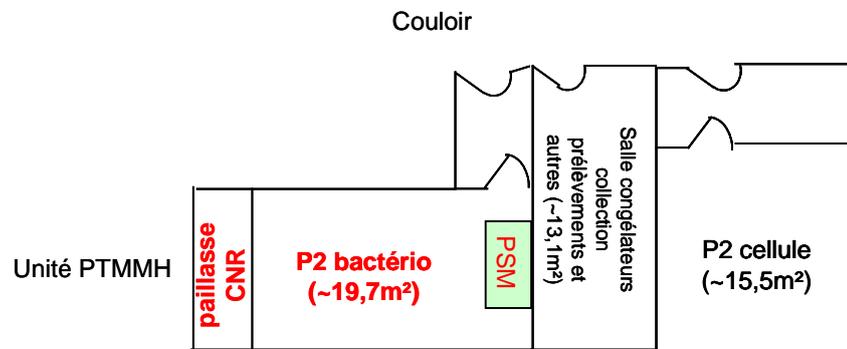
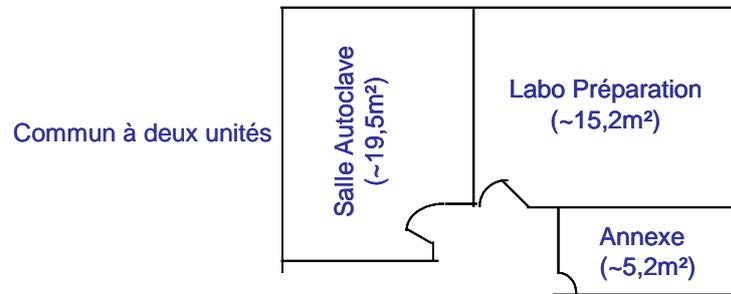
- **Plan et surface des locaux de l'unité de recherche Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines**

RdC Bât Roux
Unité PTMMH



Surfaces dédiées au CNR des Bordetelles

Sous Sol
Bât Roux
Unité PTMMH/unité UAA



Nous tenons à vous informer qu'au cours du mandat 2012-2016, des changements de locaux sont prévus. Aussi nous nous engageons à vous faire parvenir les plans des nouveaux locaux dès que ceux-ci seront définis.

- **Principaux équipements**

- 2 appareils à Champs pulsés
- 1 Chaîne ELISA
- 1 Appareil PCR Lightcycler Roche 480
- 1 extracteur d'acide nucléique
- 2 postes de sécurité microbiologique
- 5 Centrifugeuses
- 6 étuves
- Compteur à radioactivité
- 1 Microscopie à fluorescence
- 3 des Congélateurs -80° et des -20°C
- 2 gros bains agitant

C.3 Bref descriptif des thématiques de recherche dans le domaine d'expertise du CNR

L'expertise des membres du CNR concerne les domaines :

- Microbiologique des bordetelles
- Moléculaire aussi bien au niveau de l'identification des différentes espèces que de leur détection dans les prélèvements biologiques
- Protéomique aussi bien au niveau de la détection de l'expression des différentes toxines par les bordetelles qu'au niveau de leur détection dans les prélèvements biologiques

C.4 Capacités techniques actuelles du laboratoire dans le domaine spécifique du CNR

C.4.1 Liste des techniques pour le diagnostic/identification, typage évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

C.4.1.1 Diagnostic direct de la coqueluche

- **Prélèvement** : le prélèvement nécessaire au diagnostic direct de la coqueluche est l'aspiration ou l'écouvillonnage nasopharyngé. Ce prélèvement ne pose aucun problème chez le nouveau-né ou le très jeune enfant. **Le problème actuel est que peu de biologistes savent pratiquer ce type de prélèvement chez les adolescents et les adultes. Pour cette raison nous avons réalisé une vidéo permettant de visualiser la façon de faire ce prélèvement avec les membres du réseau ACTIV, F. de la Rocque et M. Boucherat visible sur le site du CNR (http://www.pasteur.fr/pasteur/film_cnr/prelev.swf).**
- **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.
- **PCR en temps réel (PCRtr)** : La détection du matériel génétique de la bactérie directement dans les prélèvements nasopharyngés se fait par PCR en temps réel. Les différents diagnostics par PCR en temps réel réalisés sont ceux ayant comme cible :
 - L'IS481 qui permet la détection des espèces *pertussis* et *holmesii* mais aussi *bronchiseptica* ;
 - Le promoteur de la toxine de pertussis spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'IS481 ;
 - Le gène BP3385 qui est spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de la séquence IS481 et qui peut aussi détecter l'espèce *B. bronchiseptica* dans quelques cas et est moins sensible que la séquence IS481 ;
 - La séquence IS1001 qui permet la détection de l'espèce *parapertussis* mais aussi

quelquefois l'espèce *bronchiseptica*.

- Le gène *recA* spécifique de l'espèce *B. holmesii*

Nous suivons, pour réaliser ces tests les recommandations qui ont été établies lors de la réunion de consensus [RIFFELMANN M., WIRSING von KONIG C.H., CARO V., GUIZO N. J. *Clin. Microbiol.* (2005)]. **Le CNR échange des contrôles qualité (CQ) avec des laboratoires de microbiologie hospitaliers ainsi que des LAM. La liste des laboratoires réalisant des contrôles qualité avec le CNR est indiquée sur le site web du CNR.**

Le diagnostic utilisant les cibles IS481 et IS1001 est remboursé depuis mars 2011.

C.4.1.2 Diagnostic biologique indirect

Il s'agit du dosage des anticorps dans le sérum des personnes infectées ou vaccinées. 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 et la sérologie, depuis mars 2011, n'est plus remboursée en France.** La technique de référence est la technique ELISA, réalisée uniquement par les laboratoires de référence dans le monde. 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).

C.4.1.3 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux

Aucun des isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* collectés en 2010, tout comme depuis la création du CNR en 1993, n'est résistant, ni à l'érythromycine, ni aux antibiotiques clarithromycine, azithromycine, triméthoprim et sulfaméthoxazole qui sont les antibiotiques recommandés lors de contacts avec un cas ou des cas groupés de coqueluche. Ils sont tous résistants à la céfalexine.

Les isolats de *B. bronchiseptica* sont comme les années précédentes résistants à la céfalexine, streptomycine et à l'ampicilline sauf trois mais sensibles aux nouveaux macrolides.

C.4.1.4 Technique de typage des isolats cliniques

La surveillance des isolats qui pourraient être résistants à l'immunité vaccinale se fait d'une part, par génotypage et typage par la technique d'électrophorèse en champs pulsés (ECP) et d'autre part, par l'analyse de l'expression des toxines et adhésines majeures. Ces adhésines et toxines sont : les protéines fimbriales, (Fim 2 et 3), l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), la pertactine (PRN), la toxine de pertussis (PT) et l'adényl cyclase hémolyse (AC-Hly). 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.

C.4.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles

C.4.2.1 Description : nombre de souches, caractérisation

Notre collection de bactéries du genre *Bordetella* regroupe actuellement plus de 1700 isolats. Nous avons poursuivi la saisie des nouveaux isolats dans l'application informatique Lagon.

C.4.2.2 Conditions de stockage

Tous les isolats reçus au laboratoire et de notre collection sont stockés en double dans trois congélateurs à -80° différents, chacun branchés sur une ligne électrique indépendante et sous surveillance électronique 24h/24h par un système d'alarme géré par le logiciel OCEASOFT. 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 12 ans en milieu BSA-SPG à -80°C. En revanche, cette durée semble décroître avec le temps sous forme lyophilisée (chute de plusieurs log en vingt ans).

C.4.2.3 Conditions de mise à disposition de ces collections

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement -MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou pas à une contrepartie financière.

Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. L'unité de recherche reconnue CNR, de part la valorisation de son savoir-faire et de son expertise sur le matériel biologique concerné, reste détenteur des prélèvements biologiques et données associées ou propriétaire des droits existants sur les souches et données associées y afférant.

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords :

- le partenaire s'engage à n'utiliser les souches, les prélèvements biologiques et données associées que dans le cadre d'un programme de recherche défini spécifiquement.
- les résultats issus du programme de recherche devront systématiquement être communiqués par le partenaire au CNR ; le CNR sera également associé ou remercié dans les publications et/ou aux communications.
- le tiers partenaire s'engage à ne pas transférer les souches, les prélèvements biologiques et les données associées à des tiers et à retourner ou détruire le matériel biologique à la fin du programme de recherche.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique et veille à ce que la valorisation du savoir-faire et de l'expertise du CNR ayant conservé, traité, trié et analysé le matériel biologique soit garantis au titre de l'accord.

Lorsque le matériel biologique et les données associées sont mis à disposition dans le cadre d'une collaboration scientifique par laquelle les partenaires s'associent de manière plus conséquente à la réalisation du programme de recherche, la valorisation des travaux menés conjointement devra tenir compte des apports respectifs de chacun des partenaires.

Les accords excluent toute garantie relative (i) à la nature appropriée des souches, des prélèvements biologiques et données associées pour une utilisation spécifique et (ii) à la qualité non-infectieuse du matériel biologique.

L'interdiction de l'utilisation du matériel biologique sur l'homme et sur les animaux, le cas échéant, est également stipulée dans l'accord.

Enfin, le CNR n'assume aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

**BILAN DES ACTIVITES
SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES**

D BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2006-2010)

D.1 Les activités au titre de l'expertise microbiologique

D.1.1 Nature des échantillons biologiques étudiés

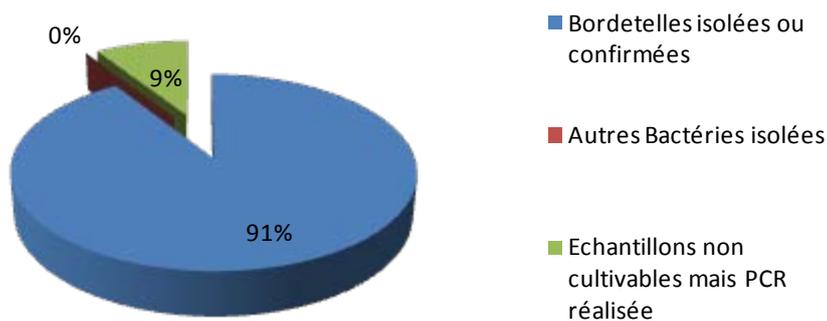
L'ensemble des prélèvements biologiques reçus au laboratoire est géré informatiquement à l'aide du logiciel Lagon. Les prélèvements biologiques (aspirations naso-pharyngées, expectorations, sérums) que nous avons reçus en 2010 provenaient essentiellement de :

- patients infectés par *B. pertussis* soit hospitalisés soit lors d'infections communautaires et dont les prélèvements sont envoyés par les cliniciens participant au réseau RENACOQ. L'unité de recherche a reçu des prélèvements dans le cadre des surveillances ACTIV et de l'étude avec le réseau SENTINELLE ;
- patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital, dans des collectivités (crèches, établissements scolaires, usines.....) ;
- 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 Généraux de France.

D.1.2 Nombre de prélèvements et d'isolats cliniques de Bordetella reçus en 2010

Nous avons reçu ou isolé en 2010 : 50 isolats cliniques de Bordetelles ainsi que deux souches vaccinales de *B. bronchiseptica* (vaccins vétérinaires) ; 5 prélèvements et 2 ADNs à partir desquels la culture et/ou la PCR ont été réalisées (Figure 1).

Figure 1 : Répartition des prélèvements reçus au CNR en 2010



Nous avons, au cours de l'année 2010, isolé ou confirmé l'identification :

Dans le cadre du RENACOQ :

47 *B. pertussis*

8 *B. paraptussis*

Figure 2 : Répartition par espèces de Bordetelles reçues ou isolées au CNR depuis 1993

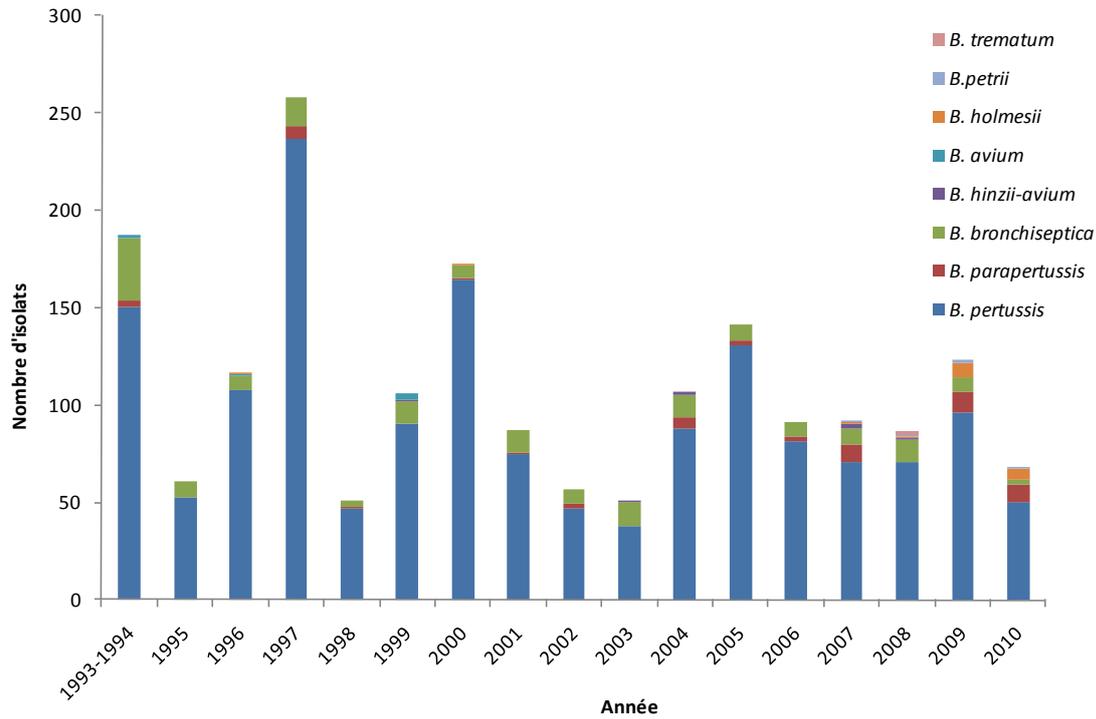


Tableau 1 : Répartition par année des principales espèces responsables de bordetelloses humaines

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

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

ANNEES DIAGNOSTICS	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
PCR	400	1100	1230	1073	2595	1616	1609	1176	1603	2500	2184	2271	2306	2588	2133
SEROLOGIE	4000	10000	11330	8665	13628	14165	13181	14293	17492	46606	49500	68803	77537	65318	42779

Provenant du collège de Bactériologie Virologie et Hygiène des Hôpitaux Généraux de France :

3 *B. pertussis* isolés par le CNR ;

1 isolat de *B. parapertussis*, reçu d'Annecy ;

3 isolats de *B. bronchiseptica* collectés chez un même patient de Paris

5 isolats de *B. holmesii*, 1 de Paris, 2 de Saint-Etienne, 1 de Brest et 1 de Limoges

1 isolat de *B. petrii* en provenance de St Priest en Jarez

Le nombre d'isolats de *B. pertussis* reçus en 2010 au CNR, est en diminution de 50% par rapport à 2009 (figure 2 et Tableau 1). Cette diminution indique que le cycle de coqueluche avait atteint son pic en 2009 et que son intensité était inférieure aux cycles précédents (figure 2 et Tableau 1).

Il est à signaler une légère baisse du nombre des isolats *B. parapertussis* et de *B. holmesii* en 2010.

Le nombre de PCR réalisées par le laboratoire Cerba (Tableau 2), a diminué de 8%, ce qui corrèle avec la baisse du nombre de cas observés. Pour la première fois depuis 1996, le nombre de sérologie a diminué sensiblement (35%) ce qui indique que les recommandations du CSHPF de 2008 (http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspa20080905_coqueluche.pdf) concernant le diagnostic biologique commencent à être suivies. Cette tendance devrait se poursuivre puisque depuis mars 2011, la PCR est remboursée et la sérologie dé-remboursée.

D.1.3 Nombre de PCR réalisées

Nous avons réalisé en 2010, 360 PCR (figure 3) dans le cadre

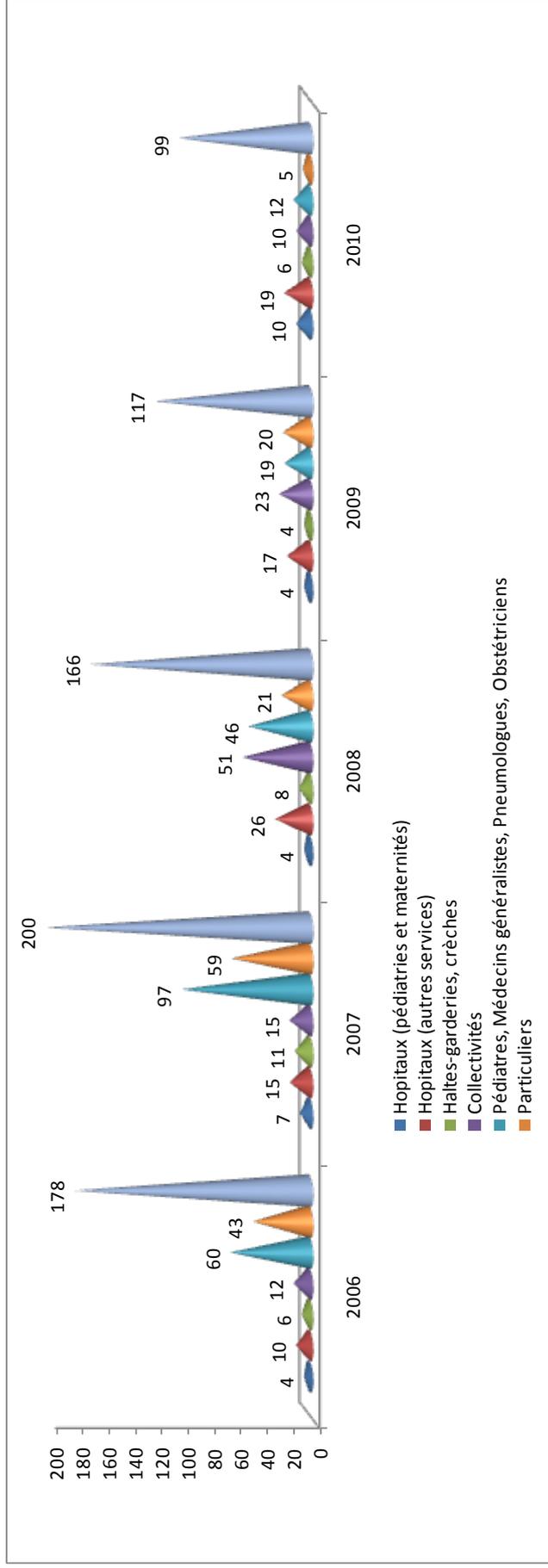
- du contrôle qualité européen (QCMD)
- de cas groupés demandés par l'ARS de Rhone Alpes
- de mise au point de nouvelles PCR afin d'identifier les différentes espèces

D.1.4 Nombre de sérologies réalisées

Nous avons réalisé en 2010, 90 sérologies (figure 3) dans le cadre :

- de la surveillance des bordetelloses ;
- de cas groupés dans des collectivités ou de contrôles demandés par les ARS.

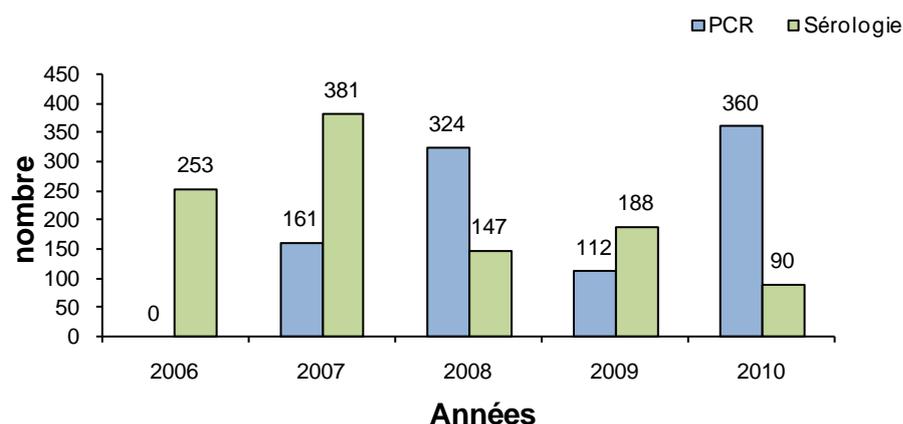
Figure 4 : Sollicitations téléphoniques ou par courriels du CNR Coqueluche pour les années 2006-2010



La **figure 3** montre le nombre de PCR et de sérologies réalisées de 2006 à 2010. Corrélant avec les données du laboratoire Cerba, le nombre de sérologies demandées au CNR a diminué en 2010.

Par ailleurs, nous avons avec nos collègues du réseau européen EUPERTSTRAIN organisé une réunion de consensus concernant les techniques sérologiques de la coqueluche. Nous avons rédigé les recommandations consensuelles qui ont été publiées (59)

Figure 3 : Diagnostics biologiques et enquêtes collaboratives réalisés par le CNR pour les années 2006 à 2010



D.1.5 Nombre d'appels et de messages

En 2010, 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 2006, 2007, 2008 et 2009 est indiquée **Figure 4**.

D.1.6 Distribution des standards et divers produits biologiques

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

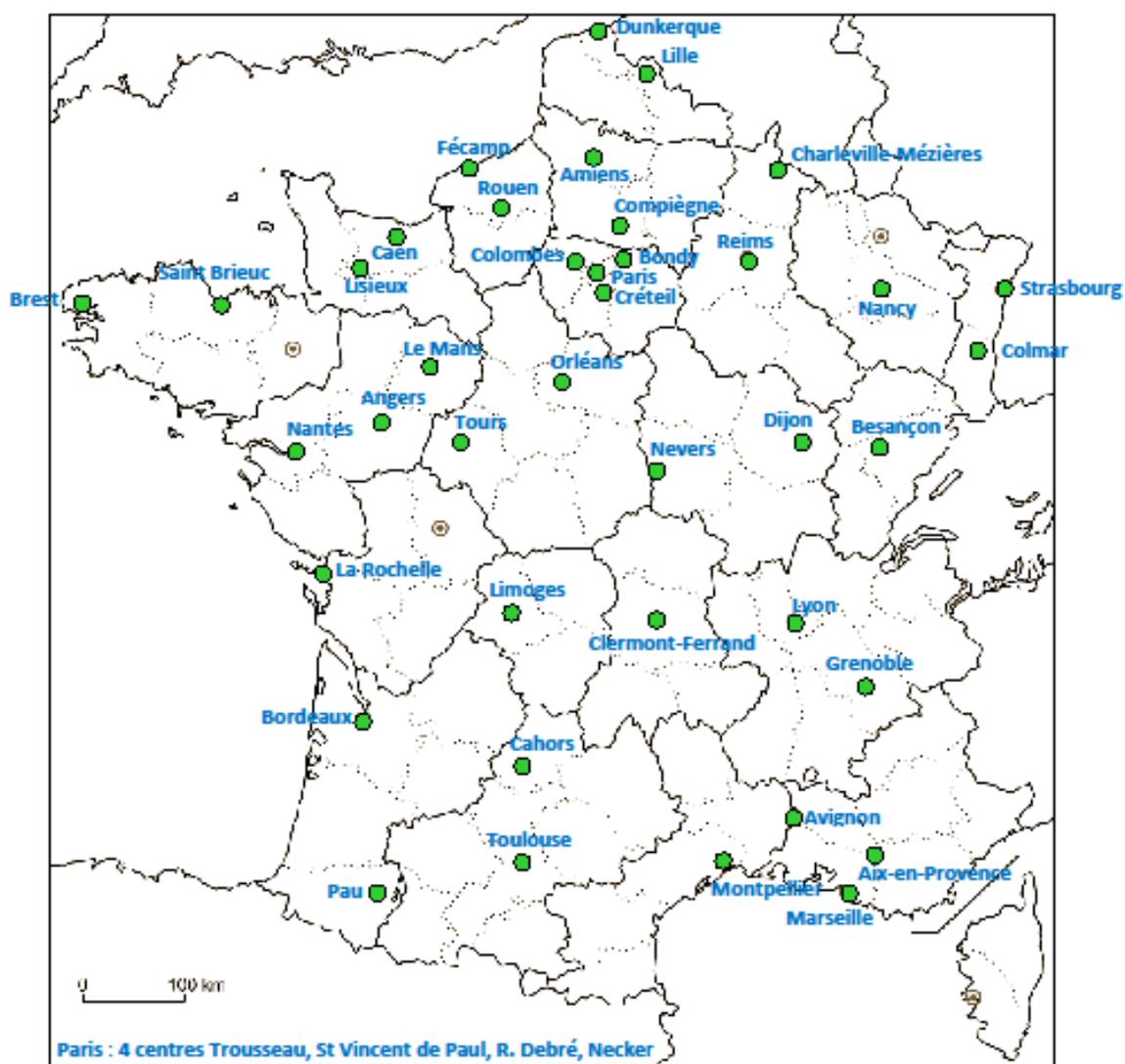
D.1.7 Techniques transférées vers d'autres laboratoires (RENACOQ ou autres)

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

Nous avons préparé des CQ pour tous les laboratoires du RENACOQ et les laboratoires hospitaliers ou LAM intéressés. Ce travail a mobilisé l'adjoint du CNR 30 jours à temps plein. Ces CQ ont été envoyés début 2010 avec un questionnaire et les résultats rendus en juin 2010. Une affiche avec l'ensemble des résultats a été présentée à la RICAI en décembre 2010 (**Annexe1**).

Des contrôles qualité ont, de plus, été échangés avec différents laboratoires en 2010 (Toulon) et quelques laboratoires du Réseau International des Instituts Pasteur (Tunisie, Saint-Petersbourg, Algérie et Bucarest).

Figure 5 : Réseau RENACOQ



D.2 Contribution à la surveillance

Pourquoi continuer une surveillance de la coqueluche et des autres bordetelloses ?

- Car la coqueluche est une des plus anciennes maladies à prévention vaccinale et qu'après plusieurs décennies de vaccination des enfants, elle n'est toujours pas contrôlée malgré un vaccin efficace et une couverture vaccinale élevée ;
- Car après trente ans de vaccination des enfants avec un vaccin coquelucheux composé de bactéries entières inactivées (**vaccin Ce**), un rappel vaccinal a été introduit chez l'adolescent en 1998, avec un vaccin différent de celui des enfants puisque composé de quelques protéines purifiées et inactivées (vaccin acellulaire ou **vaccin Ca**), un rappel vaccinal a été introduit pour les jeunes adultes et les adultes dans l'entourage d'un nouveau né en 2004 avec un vaccin ca à formulation adulte (c'est-à-dire avec une concentration plus faible d'antigènes que pour la formulation pédiatrique) et enfin en 2008, un rappel vaccinal a été introduit pour les adultes n'ayant pas eu de vaccination depuis dix ans, notamment lors du rappel décennal à 26-28 ans, pour tous les personnels médicaux et para médicaux et pour tous les adultes dans l'entourage des nouveau-nés n'ayant pas eu de vaccination coquelucheuse dans les dix dernières années [*Calendrier vaccinal 2010: Avis du haut conseil de la santé publique. Bulletin épidémiologique hebdomadaire du 22 avril 2010 n°14-15*] ;
- Car la vaccination intensive des enfants, avec un vaccin Ce, a contrôlé la circulation des isolats correspondant aux souches vaccinales mais d'autres isolats, toujours aussi virulents, différents des souches vaccinales, continuent à circuler ;
- Car l'immunité induite par les vaccins Ca est différente de celle induite par les vaccins Ce. Elle cible la virulence des isolats et si la couverture vaccinale augmente chez l'adolescent et l'adulte, la circulation des bactéries virulentes devrait diminuer ;
- Car il y a plusieurs vaccins Ca utilisés sur le terrain ;
- Car le changement de vaccin pourrait avoir des conséquences sur l'incidence des autres bordetelloses ;
- Car la durée de l'immunité induite par les vaccins Ca n'est pas connue précisément et elle doit être estimée afin d'ajuster la stratégie vaccinale au mieux.

En France, la surveillance sur le terrain est réalisée grâce à plusieurs réseaux :

- **Le réseau RENACOQ**, réseau de surveillance hospitalière, coordonné par l'InVS et comprenant 42 centres hospitaliers avec 42 pédiatres et 42 microbiologistes et le CNR (**Figure 5**) ;
- **Le réseau du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux** et le CNR ;
- **Le réseau ACTIV**, réseau de 70 pédiatres en ambulatoire et l'unité de recherche.

D.2.1 Surveillance de l'évolution de la coqueluche

Réseau RENACOQ

En 2010, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et à *B. parapertussis*. Nous sommes aidés dans cette surveillance par le laboratoire Cerba qui réalise la plupart des diagnostics biologiques par PCR et par sérologie (**cependant depuis octobre 2008 ce laboratoire, comme tous les autres en France, n'utilise plus qu'un kit commercial par immunoempreinte, que nous ne recommandons pas en raison du grand nombre de faux positifs**). Comme on peut le constater **Tableau 2** une nette diminution des tests sérologiques a été observée en 2010 (35%) et une diminution des PCR (8%) est constatée. Ces données sont encourageantes, en ce qui concerne la sérologie, puisque son abandon est recommandé depuis 2008

(http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/hcspr20080905_coqueluche.pdf). La sérologie n'est d'ailleurs plus remboursée depuis mars 2011. La diminution du nombre de PCR est à mettre en parallèle avec la diminution des cas observée dans le réseau RENACOQ en 2010 et une diminution de l'incidence chez les adolescents et les adultes observée dans une étude réalisée dans la région parisienne (24). Dix pour cent des prélèvements traités par le laboratoire Cerba sont positifs, ce qui est assez semblable à ce qui était observé les années précédentes, en supposant que tous les prélèvements nasopharyngés pour la PCR aient été réalisés de façon correcte. Il y a donc toujours une circulation du germe dans la population.

L'analyse des données obtenues pour 2010 n'est pas terminée, toutes les données cliniques n'ayant pu encore être collectées par l'InVS. Mais on observe une diminution de 50% du nombre d'isolats envoyés par le réseau au CNR, (figure 2, Tableaux 1 et 2). Ceci indique une diminution régulière, au fil des ans, de l'intensité des pics, dans tous les cas pas une augmentation. Cela est vraisemblablement une conséquence de l'introduction du rappel vaccinal adolescent en 1998 et de celui du jeune adulte en 2004. Depuis 1991, des cycles de coqueluche ont été observés, comme indiqué figure 2, en 1994, 1997, 2000, c'est-à-dire tous les trois ans, et en 2005, cette fois 5 ans après, puis en 2009, 4 ans après. L'intervalle entre les cycles va-t-il rester le même ou augmenter avec l'augmentation de la couverture vaccinale ? Seule la poursuite de la surveillance dans les dix prochaines années nous le dira.

L'analyse des isolats collectés en 2010 confirme que certains isolats de *B. pertussis* n'expriment pas tous les facteurs de virulence ciblés par les vaccins coquelucheux. En effet, 5 isolats n'expriment plus la pertactine (PRN) sur les 50 isolats analysés. Il n'y a pas de spécificité géographique.

En 2010 nous avons collecté 9 isolats de *B. parapertussis*. La particularité de ces isolats, comme ceux depuis 2007, est qu'ils n'expriment pas la PRN non plus. Là aussi pas de spécificité géographique.

Nous avons aussi analysé le nombre d'enfants de moins d'un an qui ont été recrutés par le réseau et dont on connaissait le statut vaccinal. Il s'avère que le nombre d'enfants non vaccinés varie en fonction des cycles mais que les pourcentages ne varient pas beaucoup (58 à 62%). Le pourcentage d'enfants vaccinés avec 2 ou 3 doses de vaccins est faible (2 à 6%) mais celui ayant reçu une dose est bien sur plus élevé (10 à 16%). Ces résultats suggèrent bien que deux doses de vaccins induisent une protection, certes incomplète. Il semble aussi qu'il y ait un respect plus grand des recommandations concernant l'âge des 3 injections de primo-vaccination.

D.2.2 Bordetelloses autres que coqueluche

La surveillance de ces infections est réalisée avec la collaboration du collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux.

D.2.2.1 Infections humaines à *B. bronchiseptica*

La surveillance de ces infections s'est poursuivie. Il s'agit, cette année d'un cas chez un nourrisson en contact avec un chien récemment vacciné avec un vaccin *B. bronchiseptica* atténué vivant. La comparaison de l'isolat clinique avec la souche vaccinale a montré qu'il ne s'agissait pas d'une contamination par la souche vaccinale.

D.2.2.2 Autres bordetelloses humaines

Nous avons reçu en 2010 :

- 5 isolats de *B. holmesii* :
 - 1 collecté chez un adolescent (14 ans) atteint d'une arthrite aigüe du genou
 - 1 collecté chez un adolescent (15 ans) avec une co-infection grippe
 - 1 collecté chez une personne âgée (78 ans) atteinte d'une leucémie lymphoïde chronique
 - 1 isolé d'un lavage broncho alvéolaire effectué chez un adulte (44 ans) présentant des hémoptysies
 - 1 isolat collecté chez un adulte (46 ans) hospitalisé en néphrologie
- 1 isolat de *B. petrii* collecté de la cicatrice d'une plaie de pied chez un agriculteur âgé de 44 ans

D.3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

D.3.1 Europe

Nous continuons à faire partie du réseau européen **EUpertstrain** et nous échangeons, outre des isolats cliniques, des modes opératoires et nous réalisons des enquêtes inter-laboratoires. Nous nous réunissons une fois par an.

D.3.2 International

L'unité de recherche, dans laquelle se trouve le CNR, a continué sa mission de formation au sein des Instituts Pasteur du Réseau International afin de maintenir un réseau de maladies à prévention vaccinale basé sur celui de la poliomyélite et de la rougeole.

En 2010 l'unité de recherche a poursuivi la formation d'un cadre de l'Institut Pasteur de Saint Pétersbourg. Cette collaboration avec cet Institut a déjà conduit à la rédaction de deux publications en dix ans sur la situation épidémiologique et microbiologique dans cette région (58) Cette collaboration permet d'analyser la situation épidémiologique dans cette région avec les mêmes outils qu'en France. L'observation la plus importante est que l'augmentation de la couverture vaccinale chez les enfants avec un vaccin Ce de fabrication locale, a permis de diminuer l'incidence des infections à *B. pertussis* mais pas celle des infections dues à *B. parapertussis*. **La non protection induite par le vaccin Ce des infections à *B. parapertussis* confirme nos résultats antérieurs.**

D.4 Alerte

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

Dès que les ARS ou l'InVS le sollicitent, le CNR réalise des PCR ou des sérologies de contrôle pour confirmer ou infirmer la nature de l'infection par une bordetelle lors de cas groupés.

D.5 Activités 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/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-de-la-coqueluche-et-autres-bordetelloses/identite-et-coordonnees>), et sont régulièrement mises à jour.

Nous sommes aussi régulièrement en contact avec l'AFSSAPS pour tous renseignements concernant le modèle murin, les techniques de dosages des anticorps et les vaccins (1-24).

D.6 Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

Les recherches effectuées par le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses concernent la mise au point de nouveaux tests diagnostiques des bordetelloses, ainsi que l'analyse et la comparaison des isolats circulant avec les souches vaccinales françaises. Ces recherches sont réalisées en étroite collaboration avec celles menées par l'unité de Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines. Elles concernent l'étude des interactions des bordetelles avec l'hôte et l'évolution temporelle de ces espèces en fonction de leur environnement.

D.6.1 Introduction et résumé des travaux réalisés de 1989 à 2006

Nos recherches ont porté essentiellement sur la pathogénicité des bordetelles "humaines" *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. holmesii* et de la bordetelle "animale" *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*, d'analyser l'évolution des populations bactériennes dans différents environnements, d'améliorer les moyens de diagnostic et de prévention contre ces bactéries et de mettre au point des outils thérapeutiques contre ces bactéries.

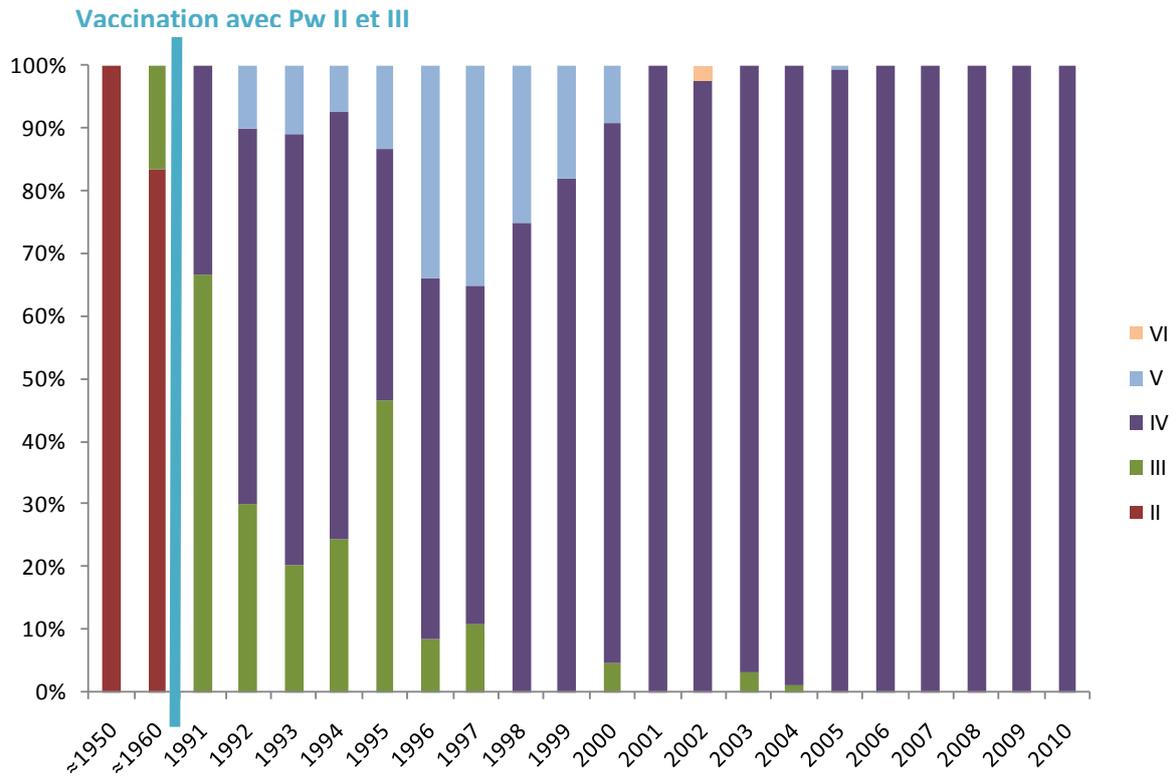
Les protéines bactériennes exprimées par les trois espèces du genre *Bordetella* les plus étudiées ont, dès leur mise en évidence, été classées en adhésines, c'est-à-dire les protéines permettant l'adhésion de la bactérie sur les cellules de l'hôte, et toxines c'est-à-dire les protéines induisant des effets cytopathogènes. 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. D'autres protéines sont en cours de caractérisation, surtout depuis que la séquence du génome des trois espèces bactériennes est connue. Seule la PT comme toxine ainsi que 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 :

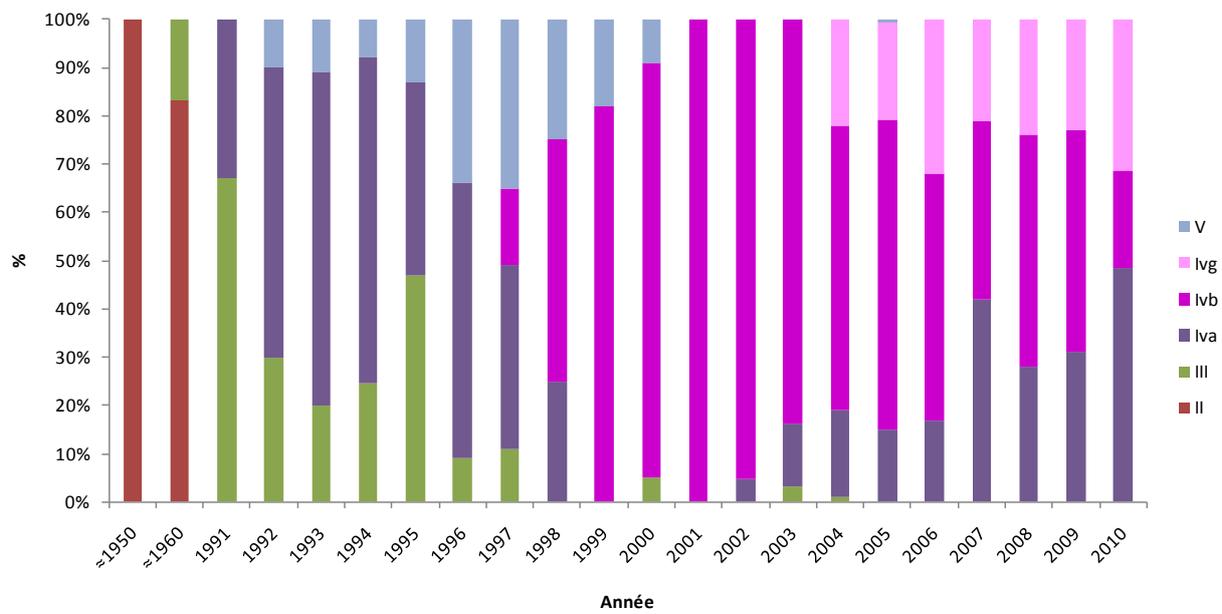
- standardiser le modèle murin d'infection respiratoire par voie intranasale,
- déterminer le rôle des différentes toxines et adhésines au cours de l'infection à l'aide de ce modèle ;
- caractériser le rôle de l'AC-Hly en tant que toxine ;
- montrer qu'elle agit en synergie avec la PT dans le cas d'une infection causée par *B. pertussis* ;
- 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.

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

A



B



A l'aide de modèles cellulaires, plusieurs observations ont été faites. *B. pertussis*, *parapertussis* et *bronchiseptica* ont un pouvoir invasif dans les cellules épithéliales trachéales humaines spécifiques, mais très faible. 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. En ce qui concerne l'espèce *bronchiseptica* la cytotoxicité serait de nouveau l'induction d'une mort cellulaire par nécrose et non par apoptose.

La population de *B. pertussis* est peu polymorphe, évolue avec le temps, dans les régions où la couverture vaccinale des enfants est très élevée, avec une diminution de la diversité génétique. 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. Il continue, cependant, à circuler des isolats différents des souches vaccinales et toujours aussi virulents.

Parallèlement à cette recherche, nous avons participé depuis 1990 à plusieurs enquêtes avec des pédiatres hospitaliers et des médecins généralistes qui 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 vaccinale a diminué au cours du temps constituent un réservoir pour les jeunes nourrissons trop jeunes pour être vaccinés. Ces observations ont conduit le Comité Technique des Vaccinations Français à introduire un rappel vaccinal pour les adolescents à 11-13 ans en 1998, et pour les jeunes adultes et le personnel hospitalier en contact avec les nourrissons en 2004.

D.6.2 Recherches effectuées par le Centre National de Référence de 2006 à 2010

D.6.2.1 Polymorphisme et évolution spatio-temporelle des espèces de Bordetelles

Espèces *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*

L'un des aspects de la coqueluche, maladie à prévention vaccinale 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, depuis 2006, a les caractéristiques bactériologiques habituelles et est toujours sensible aux macrolides. Ils expriment tous l'AC-Hly puisqu'ils sont hémolytiques sur milieu de BGS et 98% la protéine fimbriale Fim 3. Leur typage par la technique d'électrophorèse en champs pulsés (ECP) ne montre pas de changement entre 2006 et 2010. Ils appartiennent tous au groupe ECP IV (Figure 6A). La répartition en sous-groupes ne montre pas de changement par rapport à 2005. La circulation du sous-groupe IVg, apparu en 2003 n'augmente pas (Figure 6B). Une grande stabilité est observée depuis l'introduction généralisée des vaccins Ca en France pour les jeunes enfants, adolescents et adultes.

La majorité des isolats collectés et testés expriment les toxines et adhésines majeures. L'allèle de la sous-unité S1 de la PT est de type ptx S1A et celui de la PRN est de type *prn* 2, en majorité, comme la plupart des isolats circulant depuis 1990. Depuis 1993, une augmentation régulière des isolats possédant l'allèle P3 du promoteur de l'opéron codant la PT, est observée. Cependant, il est important de noter une augmentation régulière d'isolats qui n'expriment pas un des antigènes vaccinaux, la PRN.

Depuis 2007 nous observons une légère augmentation de la circulation des isolats de *B. parapertussis*. Il est important de noter que tous les isolats circulant depuis cette date n'expriment pas la PRN.

Dans le cadre du CNR, le séquençage des gènes précédemment cités est fait par la Plate-forme 8 (PF8).

Espèce *Bordetella bronchiseptica*

B. bronchiseptica est un agent pathogène du tractus respiratoire de nombreux mammifères, dont l'homme. Chez ce dernier, la bactérie se comporte comme un pathogène opportuniste, atteignant généralement des sujets immunodéprimés ou présentant une atteinte respiratoire préalable. La bactérie, dans le cas de sujets immunodéprimés peut induire des infections persistantes, à la différence de *B. pertussis* et *B. parapertussis*. Au cours des dernières années nous avons pu suivre plusieurs cas d'infections persistantes chez l'homme et comparer ces isolats avec ceux d'autres isolats d'origine humaine et d'isolats d'origine animale. Nos analyses ont porté sur environ 150 isolats indiquant que dans 66% des cas la bactérie exprime tous les facteurs de virulence mais que dans 33% des cas elle n'exprime plus l'AC-Hly.

L'analyse d'une infection avec persistance de la bactérie chez son hôte sur une période de 8 années a été réalisée par l'unité de recherche.

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. Deux observations ont été faites :

- 15 isolats ont été collectés ces quatre dernières années sur les 17 isolats reçus depuis 1993 ;
- 3 isolats parmi les plus récents ont été collectés à partir de prélèvements naso-pharyngés et ont induit un syndrome coqueluchoïde.

Cette augmentation du nombre d'isolats de *B. holmesii* est-elle due aux nouveaux moyens d'identification des bactéries ? Ce n'est pas certain puisque la plupart du temps les équipements automatiques, par exemple, n'identifient pas ces bactéries.

Cela serait-il dû au changement de vaccin coqueluchoeux ? Il n'est pas possible de répondre à cette question pour l'instant et la surveillance doit donc continuer.

Tous ces isolats n'expriment aucun des facteurs de virulence caractérisés chez les autres espèces de Bordetelles pathogènes pour l'homme et leur analyse a été entreprise par l'unité de recherche.

Nous avons aussi collaboré avec un laboratoire Canadien (57) afin de comparer des isolats cliniques invasifs Français et Canadiens et il s'avère que nous n'avons détecté aucune différence. Toutes les *B. holmesii* circulant dans le monde actuellement sont extrêmement proches.

Espèce *Bordetella petrii*

Depuis 2006, 4 cas d'infections à *B. petrii* ont été observés alors que cette bactérie était considérée comme la seule bordetelle vivant dans l'environnement.

Nous avons plus particulièrement, analysé un cas d'infection, suivi par A. Le Coustumier, chez une patiente âgée, sur une durée de un an. Six isolats ont été collectés. Il s'avère que ces isolats sont semblables entre eux par la technique ECP, confirmant leur persistance chez l'hôte mais se différencient de la souche de référence (bien que très proches) qui a été isolée dans l'environnement, par la technique ECP, mais aussi différents des autres isolats d'origine humaine. Les anticorps contenus dans le sérum de la patiente reconnaissent des protéines dans des suspensions bactériennes des autres espèces de Bordetelles mais ne reconnaissent aucun des facteurs de virulence caractérisés chez ces différentes espèces. Ce résultat confirme que l'espèce *petrii* n'exprime pas les facteurs de virulence identifiés chez les autres Bordetelles. Cependant, trois protéines, exprimées par *B. petrii* sont reconnues spécifiquement par ces sérums. Un manuscrit est paru dans Emerging Infectious Diseases (61).

D.6.2.2 Techniques de diagnostic des bordetelloses par PCR en temps réel

Développement

Depuis 2006, plusieurs diagnostics des bordetelloses par PCR en temps réel (PCRtr) ont été développés :

- les PCR en temps réel basées sur la détection de l'IS481 et l'IS1001, permettent de poser un diagnostic de bordetelloses. En effet, ces PCR ne font pas la distinction entre *B. pertussis*, *B. holmesii* et quelquefois *B. bronchiseptica* pour la PCR IS481 et entre *B. parapertussis* et quelquefois *B. bronchiseptica* pour l'IS1001. Suite à la réunion de consensus et aux recommandations énoncées [Riffelmann M, Wirsing von Konig CH, Caro V, Guiso N et al. J. Clin. Microbiol. 2005 43(10):4925-4929] nous avons tout d'abord développé une PCRtr "maison" puis suite à l'évaluation de plusieurs kits commerciaux (voir ci-dessous), nous utilisons, maintenant, le kit Argène ;
- Deux PCRtr basées l'une sur le promoteur de l'opéron *ptx* codant la toxine de pertussis (37) et spécifique de *B. pertussis* et l'autre sur le gène PB 3385 pour la détection de *B. pertussis* et quelquefois *B. bronchiseptica*. Ces deux PCR sont moins sensibles que les PCR basées sur les IS481 et 1001 ;
- Une PCRtr spécifique de *B. holmesii* utilisant le gène *RecA*

Ces PCR sont utilisées en routine au CNR.

Evaluation de kits commerciaux

Plusieurs kits commerciaux ont été évalués par le CNR entre 2007 et 2010 : Diagenode, Focus, Argène et, Hain-LifeScience

Les kits Diagenode, Focus et Argène ont donné des résultats très proches de la PCRtr "maison". Le kit Argène a été choisi par le CNR car il a l'avantage comme les autres kits cités, d'avoir un contrôle interne d'extraction/inhibition et le choix des cibles. De plus, le mélange réactionnel des PCR est prêt à l'emploi, limitant le nombre de manipulations et d'erreurs. Bien que le coût des réactifs soit environ 2,5 fois plus cher avec un temps de travail réduit de 25%, l'utilisation d'un kit commercial, contrairement à la PCR temps réel du CNR, permet de contrôler la qualité de l'extraction l'absence d'inhibition et de diminuer le risque de contamination.

Notre CNR a également participé à la comparaison de 5 kits commerciaux de PCR en temps réel pour la détection du matériel génétique des Bordetelles. L'évaluation des performances de ces kits a été faite par 3 laboratoires de bactériologie hospitaliers (Tours, Limoges et Poitiers). L'étude a consisté à tester les kits [*Bordetella* Real-Time PCR® (Diagenode), *Bordetella* R-gene® (Argène), Simplexa® *Bordetella pertussis/parapertussis* (distribué par Eurobio), PCR temps réel *Bordetella pertussis*® (distribué par Bioadvance) et SmartCycler *B. pertussis/B. parapertussis*® (Cepheid), pour la détection du matériel génétique de *Bordetella*] sur des ADN extraits à partir de 81 prélèvements naso-pharyngés de patients suspect de coqueluche. Les kits ont aussi été comparés à une technique "maison" validée dans les 3 laboratoires par le Contrôle Qualité de notre CNR. Comme tous les kits testés, cette technique "maison" cible l'IS481. En conclusion de cette évaluation, trois kits ont des performances statistiquement identiques au test "maison" (Eurobio, Cepheid et Argène) et deux kits (Diagenode et Bioadvance) ont une sensibilité insuffisante pour être utilisés pour le diagnostic de la coqueluche [Affiche annexe 2 et article soumis].

D.6.2.3 Etude Diamocoq

Le projet **Diamocoq** (diagnostics moléculaires de la coqueluche) était un programme de soutien aux innovations diagnostiques et thérapeutiques, financé par le ministère de la santé, ayant comme objectif une évaluation médico-économique du diagnostic de la coqueluche par PCR en temps réel, que S. Bonacorsi a coordonné.

Ce projet était une collaboration entre 8 équipes hospitalières (dont 6 faisant partie du réseau RENACQ) réparties sur le territoire national et le CNR. Nous avons en parallèle à l'objectif principal de l'étude, comparé les modes opératoires, pour la PCR en temps réel, de chaque laboratoire. Le CNR a apporté son expertise diagnostique et a coordonné le contrôle qualité pour l'ensemble des équipes. Ce contrôle a été organisé dix fois au cours des deux ans de l'étude. Nous en avons réalisé le bilan qui a été publié récemment (50).

D.6.2.4 Organisation de contrôles qualité

Nous avons poursuivi nos échanges avec les laboratoires hospitaliers ou privés pour comparer et évaluer la sensibilité de la technique de PCR en temps réel, utilisée en France. Des contrôles qualité (CQ) ont été préparés par le CNR et envoyés à 33 laboratoires participants. Les laboratoires ont rempli un questionnaire afin que nous puissions répertorier les méthodes d'extraction, le ou les gènes ciblés, les méthodes d'amplification, et de détection ainsi que les équipements. L'organisation de ce CQ avait aussi pour but de faire un point sur les recommandations de la réunion de consensus. Les résultats ont été présentés à la RICAI en décembre 2010 (Annexe 1). En résumé les résultats sont satisfaisants ou très satisfaisants. Néanmoins ce CQ a permis de souligner la nécessité d'une homogénéisation dans le rendu des résultats aux cliniciens.

D.6.2.5 Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des différents diagnostics biologiques de la coqueluche

Les résultats de l'enquête de transmission de la coqueluche pour laquelle nous étions responsables, de toutes les analyses par PCR, de toutes les analyses sérologiques ainsi que de toute l'analyse des isolats collectés (31) nous ont fourni le matériel nécessaire à la comparaison de la sensibilité et de la spécificité des différents diagnostics de la coqueluche.

Nous avons déterminé et comparé la sensibilité et la spécificité de deux techniques sérologiques par l'ELISA de Référence (celle du titre en anticorps anti-PT > 125 UE/ml dans le cas d'une sérologie et celle du changement d'un facteur 4 du titre en IgG anti-PT dans le cas de deux sérologies réalisées à un mois d'intervalle) et de deux PCR en temps réel ayant pour cible, soit le promoteur de la toxine de pertussis (PCR-PT), soit la séquence d'insertion IS481 (PCR-IS). Il s'avère que le diagnostic ne comportant qu'une seule sérologie a la meilleure sensibilité (64%) et une spécificité de 90%. Le changement d'un facteur 4 entre 2 sérologies a une faible sensibilité de 16% et une spécificité de 89%. La PCR-IS a une sensibilité de 45% alors que celle de la PCR-PT est de 16% et une spécificité de 85% alors que celle de la PCR-PT est de 97% (37).

D.6.2.6 Evaluation de la persistance du matériel génétique de Bordetella pertussis dans les aspirations nasopharyngées de nouveau-nés ayant la coqueluche suite à un traitement par macrolides

Ce travail a été coordonné par S. Bonacorsi à l'hôpital Robert Debré. Il a consisté à utiliser le diagnostic par PCR en temps réel pour analyser la persistance de l'ADN de *B. pertussis* (jusqu'à 22 jours) et traités par des macrolides, dans une série de prélèvements nasopharyngés réalisés chez 22 nouveau-nés atteints de coqueluche. Les analyses quantitatives indiquent que la quantité d'ADN diminue avec le temps pour la plupart des patients mais pas pour tous. La PCR en temps réel peut donc être utilisée chez le nouveau-né jusqu'à 3 semaines après le début du traitement antibiotique. Cette étude a été publiée (27).

D.7 Recherches effectuées par l'unité de recherche, en relation avec l'activité du Centre National de Référence en 2010

Entre 2006 et 2010, les questions que nous nous sommes posées étaient les suivantes :

- ❖ Comment évoluent les populations de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis* au cours du temps en France ?
- ❖ Comment évoluent les populations de *Bordetella pertussis* dans des régions n'ayant pas la même stratégie vaccinale que la France ?
- ❖ La population de *Bordetella bronchiseptica* est-elle homogène ?
- ❖ Comment évolue une Bordetelle au cours d'une infection persistante chez l'homme ?
- ❖ Quelle est l'incidence de la coqueluche chez les adolescents et les adultes en 2008-2009 dans la région parisienne ?
- ❖ Quelle est la durée de l'immunité induite par les vaccins coquelucheux ?
- ❖ Quelle est l'immunité de la population adulte vaccinée selon les recommandations françaises contre le tétanos, la diphtérie et la coqueluche ?
- ❖ Des sujets sans histoire vaccinale connue induisent-ils une réponse après vaccination avec un vaccin DTPCa ?
- ❖ Peut-on induire des réponses humorales chez des enfants séropositifs ?

D.7.1 Comment évoluent les populations de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis* au cours du temps en France ?

Pour répondre à cette question nous avons analysé cette évolution aussi bien au niveau du génome qu'au niveau de l'expression des facteurs de virulence

D.7.1.1 B. pertussis

Au niveau du génome : Nous avons utilisé plusieurs techniques pour comparer les isolats de l'ère pré-vaccinale à ceux de l'ère post-vaccinale pendant laquelle était utilisé un vaccin coquelucheux Ce et ceux de l'ère post-vaccinale actuelle depuis que nous utilisons des vaccins coquelucheux Ca. Les techniques que nous avons développées et/ou utilisées sont une puce à ADN portant les 3461 gènes (91%) du génome de *B. pertussis* (26), l'hybridation soustractive (40), le séquençage des génomes (39; 49) et le génotypage. Il a pu être mis en évidence une influence de l'immunité de la population sur la population bactérienne puisque la vaccination avec le vaccin à Ce a permis le contrôle des isolats semblables aux souches. Malheureusement, des isolats circulent toujours et ils sont aussi virulents que les isolats de l'ère pré-vaccinale. Nous avons pu montrer que le génome des isolats a diminué temporellement et contient plus de séquences répétées, en particulier des séquences d'insertion, que le génome des isolats de l'ère pré-vaccinale (26 ; 39). Ces études nous ont 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. Comme tous les isolats qui continuent à circuler sont virulents et que la couverture vaccinale augmente avec les rappels adolescents et adultes, et si cette hypothèse est correcte, une diminution de la circulation des isolats virulents devrait être observée.** La présence d'un grand nombre de copies d'IS dans le chromosome des isolats actuels pourrait faciliter la délétion des gènes de virulence (44).

Par ailleurs, les isolats de *B. pertussis* circulant dans plusieurs pays européens ont été comparés en utilisant la technique ECP dans le cadre du réseau EUpertstrain (32). L'analyse montre une certaine homogénéité en Europe.

Au niveau de l'expression des déterminants de virulence : Depuis la création du CNR nous avons aussi analysé l'expression des principaux facteurs de virulence. **Il s'avère que l'on observe depuis 2007 la circulation d'isolats n'exprimant pas la PRN qui représente 9% des isolats reçus depuis 2009.** Il y a aussi quelques isolats n'exprimant pas la PT ou la FHA mais ceux-ci sont très rares et ont toujours existé. La non expression de la PRN est due soit à l'intégration d'une IS dans le gène codant la PRN, soit à une délétion d'une partie du gène codant la PRN ou de tout le gène soit à des additions de nucléotides dans le gène) ce qui va dans le sens de l'hypothèse formulée précédemment. Ces isolats sont toujours virulents pour les nouveau-nés, dont la plupart a été hospitalisé. Ils ont une pathogénicité semblable aux isolats exprimant la PRN (49). Seuls, pour l'instant, les isolats n'exprimant pas la PT sont moins virulents car ils ne provoquent pas d'hyperlymphocytose, ce qui corrèle avec le fait qu'ils ne sont pas aptes à induire une infection létale dans le modèle murin.

En ce qui concerne l'AC-Hly, toxine non incluse dans les vaccins Ca, celle-ci est toujours exprimée. La partie de son gène de structure codant la partie immunodominante ne varie pas, ce qui est un argument en faveur de l'importance de cette toxine pour *B. pertussis* lors de son interaction avec l'hôte (48).

D.7.1.2 *B. parapertussis*

Au niveau du génome : L'analyse des isolats de *B. parapertussis* a montré que le polymorphisme est très restreint jusqu'en 2007, année où une augmentation du nombre d'isolats a été observée. Ces derniers isolats peuvent être différenciés par ECP des isolats circulant auparavant. **Le génome de deux isolats dont l'un exprime et l'autre n'exprime pas la PRN (et qui font partie des deux groupes ECP mis en évidence) ont été séquencés et à l'exclusion de l'expression de la PRN, très peu de différence a été détectée entre les deux génomes (56).**

Au niveau de l'expression des facteurs de virulence : 95% des isolats depuis 2007 n'expriment plus la PRN ! Ceci est dû à une délétion d'un nucléotide 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, délétions qui induisent un codon stop. Ces isolats sont tout aussi virulents que les isolats exprimant la PRN dans nos modèles murins et cellulaires, ce qui confirme les données cliniques. Ce résultat suggère que la PRN n'est pas essentielle pour l'interaction avec l'hôte. Pourquoi ces isolats circulent-ils maintenant alors qu'il n'y a pas de réaction croisée entre les protéines de *B. pertussis* et celles de *B. parapertussis* et que l'on ne s'attend pas à une influence de l'immunité avec le vaccin Ca sur la circulation de *B. parapertussis* ? Nous n'avons pas la réponse à cette question pour l'instant mais il est important de continuer la surveillance de ces infections qui semblent augmenter avec l'utilisation des vaccins Ca (56).

D.7.2 Comment évoluent les populations de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis* dans des régions n'ayant pas la même stratégie vaccinale que la France ?

Pour répondre à cette question nous avons comparé les isolats circulant en France avec ceux circulant :

- dans une région ayant utilisé le même vaccin Ce que la France et la même stratégie vaccinale : Région de Buenos Aires ;
- dans un pays utilisant un vaccin Ce local mais ayant la même stratégie que nous : Finlande ;
- dans une région utilisant un vaccin local mais où la couverture vaccinale a varié : Saint-Petersbourg ;
- dans une région où la couverture vaccinale avec le même vaccin Ce que la France est très faible : Niakhar au Sénégal ;

Buenos Aires et France : Ces deux régions ont une couverture vaccinale élevée et le même vaccin Ce. Il s'avère que les isolats de *B. pertussis* circulant dans ces deux pays sont semblables et expriment les mêmes facteurs de virulence et la même adhésine, Fim 3 (29). Il n'y a pas de donnée concernant les infections à *B. parapertussis* dans la région de Buenos Aires.

Finlande et France : Ces deux pays ont une couverture vaccinale élevée et ont utilisé un vaccin Ce pendant plusieurs décennies. Il s'avère que les isolats de *B. pertussis* sont très proches mais n'ont pas évolué exactement de la même façon. En effet, il y a une vingtaine d'années, les isolats finlandais et français étaient très proches car ils appartenaient au même groupe ECP mais pas au même sous groupe (IV gamma puis alpha puis beta pour la Finlande et IV alpha puis beta et maintenant gamma pour la France). Par ailleurs, les isolats finlandais exprimaient en majorité l'adhésine Fim 2 et les français en majorité l'adhésine Fim 3. Après analyse des souches vaccinales des deux pays, il s'avère que les souches finlandaises expriment plus la protéine fim 3 alors que les souches vaccinales françaises expriment plus la protéine fim 2. Il y a donc bien aussi une influence de l'immunité vaccinale de la population sur les isolats (25). Les isolats de *B. parapertussis* finlandais étaient jusqu'en 2006 tout à fait semblables aux isolats français.

Saint Petersburg et France : A Saint-Petersbourg, le vaccin Ce utilisé est un vaccin local. De plus, la couverture vaccinale était faible pendant les années 90 mais a augmenté dans les années 2000. Il s'avère que les isolats circulant sont maintenant très proches des isolats qui circulent en France, même au niveau des adhésines (après avoir exprimé soit Fim2 soit Fim 3 soit les deux, tous les isolats expriment maintenant Fim3). Cependant, tous les isolats de *B. pertussis* expriment les facteurs de virulence et il n'a pas été détecté d'isolat n'exprimant pas la PRN. La comparaison des isolats circulant depuis 1999 dans la région de Saint-Petersbourg nous a permis de montrer aussi que lorsque la couverture vaccinale avec le vaccin Ce local augmente l'incidence de la coqueluche due à *B. pertussis* diminue ce qui est attendu si le vaccin Ce est efficace. Cependant, celle due à *B. parapertussis* ne se modifie pas suggérant que l'immunité induite par le vaccin Ce ne protège pas contre les infections dues à *B. parapertussis* (58).

Niakkhar, Sénégal et France : Lors de l'essai clinique comparant notre vaccin Ce et un vaccin Ca-2 composants qui a eu lieu au Sénégal entre 1991 et 1995, un grand nombre d'isolats cliniques avait pu être collecté. Dans ce pays la couverture vaccinale était très faible, comparée à celle de la France. Nous avons donc comparé les isolats collectés à cette époque avec ceux circulant en France. Il s'avère que les isolats collectés au Sénégal sont très semblables aux isolats circulant en France durant l'ère pré-vaccinale mais pas en 1991-1995, ni actuellement. Il y a donc bien une influence de l'immunité de la population humaine sur la population bactérienne (42). Il n'avait pas été isolé de *B. parapertussis* au Sénégal.

L'ensemble des ces études confirme ce qui était observé en France c'est-à-dire une influence de l'immunité de la population sur l'évolution des populations microbiennes.

D.7.3 La population de *Bordetella bronchiseptica* est-elle homogène ?

Nous avons initié une comparaison des isolats collectés sur l'homme depuis 1993 et comparé avec des isolats d'origine animale.

Au niveau génomique : Dans le cas de cette espèce, le polymorphisme est beaucoup plus grand, comme le montre les résultats de la technique ECP mais aussi le génotypage de la PRN ou celui du gène codant l'AC-Hly (48). La technique ECP est très difficile à utiliser pour cette espèce en raison de son grand polymorphisme. Pour cette raison nous avons mis en place la technique du Multi Locus Sequence Typing (MLST) et nous allons maintenant analyser toute notre collection.

Au niveau de l'expression des facteurs de virulence : A ce niveau un grand polymorphisme est aussi observé avec, en plus, 25% des isolats qui n'expriment pas l'AC-Hly et dans une proportion plus rare aussi la PRN. De plus, la structure du LPS varie beaucoup. En ce qui concerne le dernier facteur, en collaboration avec M. Caroff (Université d'Orsay) nous avons comparé des isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine soit en Phase I c'est-à-dire exprimant tous les facteurs de virulence soit en phase IV c'est-à-dire n'exprimant plus les facteurs de virulence car possédant une protéine régulatrice non fonctionnelle. Il a pu être mis en évidence des différences chez un même isolat dans la structure du LPS en fonction de l'expression ou non des facteurs

de virulence. **Ce changement dans la structure du LPS pourrait avoir une relation avec la capacité des bactéries à survivre intracellulairement (62).**

D.7.4 Comment évolue une Bordetelle au cours d'une infection persistante chez l'homme ? Ex de *Bordetella bronchiseptica*

Nous avons analysé plus finement la régulation de l'expression des facteurs de virulence chez cette espèce, et porter nos efforts sur les isolats humains induisant des infections persistantes. En effet, en suivant quelques patients sur plusieurs années, en collaboration avec A. Le Coustumier, nous avons pu observer que les isolats persistaient et qu'ils se modifiaient au cours du temps. Ces modifications concernent dans la moitié des cas la perte de l'expression de l'AC-Hly puis de la PRN (favorisant la persistance intracellulaire ?). Elles concernent aussi dans plusieurs cas l'expression constitutive de la FHA et la structure du LPS. Nous avons initié une analyse du transcriptome pour étudier l'expression de l'ensemble des protéines. Pour cela nous avons utilisé des puces-oligonucléotides 70 mers correspondant à la totalité des gènes de *B. pertussis*. Nos résultats préliminaires indiquent que l'expression de deux facteurs est nécessaire pour une pathogénicité élevée : AC-Hly et BteA. Les différences entre les isolats, qu'ils soient d'origine animale ou humaine, seraient dues à une expression différentielle de ces deux facteurs.

Par ailleurs, nous avons entrepris la séquence du génome d'un isolat d'origine animale qui est à responsable d'une infection persistante chez une femme immunodéprimée afin de la comparer avec celle de deux isolats persistant chez cette femme malgré une antibiothérapie (S. Guillot *et al.* Soumis).

D.7.5 Quelle est l'incidence de la coqueluche chez les adolescents et les adultes en 2008 2009 dans la région parisienne ?

La coqueluche est désormais considérée comme une des étiologies à évoquer devant une toux chronique de l'adulte. Cette pathologie doit être évoquée si une toux, sans cause évidente, persiste ou s'aggrave au-delà d'une semaine, surtout si elle revêt les caractéristiques d'une toux coquelucheuse (recrudescence nocturne et insomnante) Du fait du caractère souvent atypique de la maladie, une confirmation biologique du diagnostic est devenue indispensable. En Europe, l'objectif de l'OMS étant de réduire l'incidence de la coqueluche à moins de 1 pour 100 000 habitants d'ici 2010. Cette pathologie est actuellement surveillée en France par l'intermédiaire du réseau RENACOQ qui est un réseau hospitalier pédiatrique et du réseau ACTIV composé de pédiatres en ambulatoire. Les données épidémiologiques dans la population adulte ne sont donc qu'indirectes. L'objectif de l'étude que nous avons entreprise dans la région parisienne avec le réseau de médecins généralistes *Sentinelles*, était d'estimer l'incidence de la coqueluche dans les populations adulte et adolescente mais aussi de préciser les caractéristiques cliniques et biologiques des cas de coqueluche chez l'adulte.

En 10 mois, dans le cadre de cette étude, 98 PCR et 250 sérologies ont été réalisées. Nous n'avons jamais pu réaliser de culture car les prélèvements arrivaient au CNR beaucoup trop tardivement. Par ailleurs, une des constatations majeures de cette étude est que les laboratoires d'analyses médicales (LAM) ne savaient pas et, souvent refusaient, de réaliser des aspirations nasopharyngées chez les adolescents et adultes, ce qui posait un problème pour le diagnostic biologique par culture ou PCR ! Pour cette raison nous avons réalisé une vidéo et rédigé un protocole qui est accessible sur le site du CNR et a été envoyé par la DGS à tous les LAM de France (http://www.pasteur.fr/pasteur/film_cnr/prelev.swf).

Lors de cette étude, **l'incidence estimée de la coqueluche chez l'adulte dans cette étude est de 145 pour 100 000 habitants (24).**

Cette incidence est plus faible que celle que nous avons estimée en 2000 et ceci est probablement du au fait que la couverture vaccinale en France a augmenté avec l'introduction du rappel vaccinal adolescent. **Outre le problème du prélèvement naso-pharyngé, cette étude a aussi permis de mettre en évidence que seuls 40% des médecins traitaient leurs patients avec des macrolides, comme recommandé !**

Nous avons aussi participé à l'élaboration d'un questionnaire sur la connaissance et l'application des recommandations vaccinales concernant la coqueluche par la Médecine du travail des établissements de santé de Paris. Ce questionnaire a été envoyé trois ans après l'introduction de la stratégie dite du "cocooning" en France. Le taux de réponse a été de 80%. Les médecins ont déclaré avoir connaissance des recommandations (92,5 %) mais seuls 48,8% pratiquent la vaccination ciblée des jeunes adultes. En général le taux de couverture du personnel hospitalier est faible. Après plusieurs années et malgré une disponibilité du vaccin en France l'application des recommandations vaccinales reste à améliorer. Le CNR s'efforce de les diffuser (54)

D.7.6 Quelle est la durée de l'immunité induite par les vaccins coquelucheux ?

- **Comparaison de la durée de l'immunité induite par le vaccin Ce ou le vaccin Ca-3 :** Pour deux cohortes d'enfants l'immunité à médiation humorale vis-à-vis de différents antigènes tels les protéines fimbriales, la FHA, la PRN, la PT et l'AC-Hly et sur une partie des enfants l'immunité à médiation cellulaire vis-à-vis de FHA, PRN et PT, ont été caractérisées à deux temps, à 3 et 6 ans après primo vaccination et rappel à 16-18 mois avec soit le vaccin Ce soit le vaccin Ca-3. Des taux très faibles d'anticorps anti-PT ont été détectés aux deux temps, confirmant l'absence de contact de ces enfants avec *B. pertussis* et donc la protection. Les réponses cellulaires induites par les deux vaccins sont de type Th1, d'intensité plus importante après vaccination par le vaccin Ca-3 et persistent au moins 6 ans. **Cette étude suggère que les deux vaccins induiraient une immunité de durée semblable.** Le fait que le vaccin à germes entiers induise une durée d'immunité semblable en 1999 à celle déterminée en 1993-1994 suggère que l'évolution temporelle des isolats de *B. pertussis* n'a pas modifié la protection induite par le vaccin (30)
- **Réseau ACTIV :** Depuis 2002, nous collaborons avec le réseau ACTIV, réseau de pédiatres de ville. Dans ce cadre, nous validons les cas en fonction des diagnostics biologiques utilisés. De plus, pour les patients de la région parisienne, nous réalisons, nous-mêmes, les diagnostics biologiques tels que la culture, la PCR et la sérologie par la technique ELISA. L'objectif principal de cette surveillance est de déterminer la durée de protection suite à une vaccination par un vaccin coquelucheux. Les objectifs secondaires sont de déterminer l'intérêt des différents diagnostics biologiques, de collecter des isolats et de tester les nouveaux diagnostics biologiques sur les prélèvements obtenus.

De 2002 à 2006, nous avons pu montrer que la durée de protection induite par une primo-vaccination et un rappel à 16-18 mois, avec un vaccin Ce, est d'environ 8-10 ans. Cette durée est semblable à celle déterminée en 1993-1994, malgré la variabilité des isolats (38).

Entre octobre 2006 et décembre 2010, 198 suspicions de coqueluche ont été déclarées par 56 pédiatres répartis sur tout le territoire français. Soixante et onze cas ont été confirmés (36%). Le nombre de cas de coqueluche confirmés a baissé de 91 à 71 entre les 2 périodes qui ont toutes les deux duré 4 ans. Cette baisse est probablement due à l'augmentation de la couverture chez les adolescents. Cette baisse peut être considérée comme réelle car il faut tenir compte du changement de méthodologie entre ces 2 périodes. En effet, en période 2 la PCR en temps réel utilisée est plus sensible que la PCR classique utilisée en période 1 et la technique sérologique est la technique de référence ELISA alors qu'en période 1 il s'agissait de l'immuno-empreinte. L'utilisation de ces techniques diagnostiques, plus sensibles auraient donc du augmenter le nombre de cas. On observe aussi que les praticiens ont d'avantage ciblé la pathologie en période 2 (198 versus 383 inclusions) et augmenté de façon notable le pourcentage de diagnostics validés (26 à 36%). Dans tous les cas, le faible nombre de cas malgré la variabilité des isolats suggère une bonne protection vaccinale.

En ce qui concerne le but premier de l'observatoire, c'est à dire l'évaluation de la durée de protection conférée par la vaccination, nous ne disposons que de peu de cas (14 enfants en

période 2 ont reçu 4 doses de vaccin Ca, 7, 4 doses de vaccin Ce et 18 des doses de vaccins Ce et Ca) et nous ne pouvons parler que de tendance : Vaccin Ce, 10,3±1,5 ans et vaccin Ca, 6,1±2,2 ans mais encore une fois les chiffres sont très faibles.

On constate également que la majorité des contamineurs des nourrissons ou jeunes enfants sont soit des adultes (51% des cas) soit des adolescents de 10 à 12 ans n'ayant pas eu leur rappel (33%) soit des enfants de moins de 10 ans (16%) de leur entourage.

Cette surveillance va donc se poursuivre pour savoir si ces tendances se confirment ou s'infirmement.

D.7.7 Quelle est l'immunité de la population adulte vaccinée selon les recommandations françaises contre le tétanos, la diphtérie et la coqueluche ?

L'objectif de l'étude était d'évaluer le titre en anticorps (Ac) anti-diphtérie, tétanos et coqueluche (anti-PT) dans une population adulte vaccinée selon les recommandations françaises. Cette étude séro-épidémiologique prospective, transversale, a été réalisée dans 7 centres de vaccination français chez des sujets de 18 à 60 ans ayant reçu au moins 6 doses de vaccin contre la diphtérie et le tétanos et pour les sujets de moins de 40 ans au moins 4 doses de vaccin contre la coqueluche. Les données de 331 sujets ont été analysées : ces adultes vaccinés selon les recommandations françaises étaient considérés comme protégés à 98,5% contre le tétanos, mais seulement à 86,7% contre la diphtérie (62,7% seulement pour les 50-60 ans). Des titres d'anticorps anti-PT suggérant une infection récente par *Bordetella pertussis* étaient observés dans 7,4% des cas et jusqu'à 13,1% des jeunes adultes entre 18 et 29 ans. **Ces résultats soulignent l'importance des nouvelles recommandations vaccinales concernant les rappels vaccinaux contre la diphtérie et la coqueluche chez l'adolescent et à l'âge adulte (46).**

D.7.8 Des sujets sans histoire vaccinale connue induisent-ils une réponse après vaccination avec un vaccin DTPCa ?

L'objectif de cette étude était de déterminer la réponse humorale induite chez des adultes de 18 à 50 ans dont l'histoire vaccinale est inconnue. Cette réponse a été évaluée chez ces adultes un mois après deux vaccinations reçues à un mois d'intervalle : tout d'abord un vaccin dTP puis un mois après un vaccin dTPCa. 136 sujets ont été inclus dans l'étude. Leur âge moyen était de 33 ans. Un mois après avoir reçu leur vaccination, tous les sujets avaient un taux d'anticorps considéré comme protecteurs vis-à-vis de la diphtérie, du tétanos et de la polio (sauf un sujet qui n'avait pas d'anticorps anti-polio 1). 94,4% des sujets avaient des anticorps anti-PT > à 8UI/ml indiquant une positivité. **Cette étude montre que cette stratégie vaccinale appliquée à des sujets dont l'histoire vaccinale est inconnue induit une réponse humorale élevée (52)**

D.7.9 Peut-on induire des réponses humorales chez des enfants infectés par le HIV

En collaboration avec L. Baril et les Instituts Pasteur de Yaoundé et Bangui nous avons analysé les réponses humorales induite par le vaccin combiné Diphtérie-Tétanos-Coquelucheux entier chez des enfants infectés (78) ou non (50) par le virus HIV. **Il s'avère que les réponses en anticorps sont plus faibles chez les enfants infectés.** Cette étude montre la nécessité d'introduire un rappel vaccinal à cette population. Par ailleurs, des résultats préliminaires montrent des différences au niveau de l'immunogénicité des vaccins Ce suivant les producteurs (45).

LISTE DES PUBLICATIONS

E LISTE DES PUBLICATIONS

E.1 Publications nationales

2006

1. Floret D, Bonmarin I, Deutsch P., Gaudelus J., Grimprel E., Guerin N., Guiso N., Morer I. Conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de coqueluche. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique** 2006, Vol 46:41 -51
2. Guiso N. (2006) Le point sur la vaccination coquelucheuse en 2006. **Revue Francophone des Laboratoires**, Vol 381:67-71
3. Bonmarin I, Bouraoui E, Guiso N., Njamkepo E. et les participants du Renacoq. (2006) Renacoq : surveillance de la coqueluche à l'hôpital en 2004. **B.E.H.** 17 du 25 avril 2006, 113-115
4. Guiso N. (2006) Vers une stratégie optimale de vaccination contre la coqueluche ? **Pédiatrie Pratique** Vol 177:12
5. Revue : **Mt pédiatrie** coordonnée par Nicole Guiso (2006) : Vol 9 (3)
Guiso N. Editorial 135-137
Guiso N., Reinert P : La coqueluche : physiopathologie et Immunologie 155-159
Gaudelus J, Guiso N., Cohen R.: Quel vaccin coquelucheux et à quel âge ? 160-169
Caro V. Quelles nouveautés sur un agent pathogène centenaire ? 147-154

2007

6. Guiso N. Impact de la vaccination sur l'épidémiologie des maladies infectieuses - exemple de la coqueluche. **Méd Sci** 2007, n° 4 (23) 399-403
7. Guiso N. *Bordetella*. EMB (Encyclopédie Médico-Biologique consultable uniquement sous internet) 2007
8. Guiso N. Gibaud AS. et spécialistes du CHU de Nantes. La coqueluche en 2007 : réémergence d'une maladie oubliée. **Le quotidien du médecin**. Octobre 2007.
9. Guiso N., Seban S. Coqueluche quand l'évoquer face à une toux ? **La revue du praticien** 2007 n° 788-789 (21) : 1048-1050
10. Caro V., Guiso N. Le congrès du centenaire de *Bordetella pertussis* (8^{ème} Symposium International *Bordetella*) Paris, 7-10 novembre 2006. **Bull. Soc. Fr. Microbiol**, 2007 ; 22(3) 175-178

2008

11. Guiso N. Après la coqueluche de l'enfant, la coqueluche de l'adulte. **Revue Francophone des Laboratoires** (2008) 399bis : 29-31
12. Gaillat J, Guiso N. Toux rebelles (coqueluche, infections à *Mycoplasma* et *Chlamydomphila pneumoniae*) : aspects cliniques, thérapeutiques et diagnostics biologiques. **Feuillets de Biologie** 2008 ; n°281:61-65

13. Guiso N. Coqueluche nosocomiale : actualités, méthodes diagnostiques et prévention. **Hygiènes** (2008) 16 (4):351-355

14. Gaudelus J, Guiso N. Vaccins anticoquelucheux In: progrès en pédiatrie 23, **Vaccinologie** (2008). Gaudelus J. eds, Editions DOIN chapitre 12:149-163

2009

15. Guiso N. Coqueluche chez l'adulte. **La Revue du Praticien Médecine Générale** (2009) 23 (821) : 314-315

16. Bonmarin I, Bouraoui L, Guiso N., Levy-Bruhl D. La coqueluche : collecte de données et choix des stratégies vaccinales. **Med Mal Infect** (2009) 39(5): 271-277

17. Lasserre A, Riviere M, Blanchon T, Alvarez F, Gaillat J, Romain O, Bouhour D, Guiso N. Connaissance et application des recommandations vaccinales concernant la coqueluche par la médecine du travail des établissements de santé de Paris. **Med Mal Infect** (2009): 39(5):325-329

18. Guiso N. Coqueluche du nourrisson, de l'enfant et de l'adulte. **Traité EMC** (Encyclopédie médico-chirurgicale Pédiatrie/Maladies Infectieuses consultable sous internet) 4-270-A-50

2010

19. Belmin J, Bouree P, Camus D, Guiso N., Jeandel C, Trivalle C, Veyssier P. Vaccination in older adults: development of an educational tool, Vaxisenior, in France. **Expert Rev. Vaccine** (2010) 9(3 suppl):15-20

20. Guiso N. Vacciner l'adulte pour protéger le jeune enfant. **Journal de pédiatrie et de puériculture** (2010) 23:115-118

21. Société Française de Microbiologie. Guiso N. *Bordetella* spp in **REMIC** Société Française de Microbiologie 4^{ème} Ed; 2010: 189-191

22. Bille E. Lesage F. Guiso N. Quesne G. Berche P. Le Monnier A. *Bordetella bronchiseptica*-associated acute chest syndrome in a child with sickle cell disease. **Archive de Pédiatrie** (2010) 1:41-44

2011

23. Zouari A., Smaoui H., Njamkepo E., Mnif K., Ben Jaballah N., Bousnina S., Barsaoui S., Sammoud A., Ben Becher S., Guiso N., Kechrid A. The re-emergence of pertussis in Tunisia. **Med Mal Infect** (2011) 41:97-101

24. Lasserre A, Laurent E, Turbelin C, Hanslik T, Blanchon T, Guiso N. Pertussis incidence among adolescents and adults surveyed in general practices in the Paris area, France, May 2008 to March 2009 **Eurosurveillance** (2011) 16(5) pii 19783 du 03 fév 2011 <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19783>

E.2 Publications internationales

2006

25. Caro V., Elomaa A, Brun D., Mertsola J, HE Q, Guiso N. (2006) *Bordetella pertussis*, Finland and France. **Emerg Infect. Dis.** 12(6):987-989
26. Caro V., Hot D., Guigon G., Hubans C., Arrive M., Soubigou G., Renauld-Mongenie G., Antoine R., Loch C. Lemoine Y., Guiso N. (2006) Temporal analysis of French *Bordetella pertussis* isolates by comparative whole-genome hybridization. **Microbes Infect.** 8:2228-2235
27. Bonacorsi S, Farnoux C, Bidet P, Caro V., Aizenfisz S, Benhayoun M, Aujard Y, Guiso N., Bingen E. (2006) Treatment failure of nosocomial pertussis infection in a very-low-birth-weight neonate. **J.Clin Microbiol.** 44(10):3830-3832
28. Patin E, Barreiro LB, Sabeti PC, Austerlitz F, Luca F, Sajantila A, Behar DM, Semino O, Sakuntabhai A, Guiso N., Gicquel B, McElreavey K, Harding RM, Heyer E, Quintana-Murci L (2006) Deciphering the Ancient and Complex Evolutionary History of Human Arylamine N-Acetyltransferase Genes. **Am J Hum Genet** 78(3):423-36

2007

29. Caro V., Bouchez V., Gatti B., Agosti MR., Gonzalez Ayala SE., Guiso N. Pertussis in Argentina and France. **Vaccine** (2007) 25 : 4335-4339
30. Guiso N., Njamkepo E., Vie Le Sage F, Zepp F, Meyer CU, Abitbol V, Clyti N, Chevallier S. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. **Vaccine.** (2007) 25(8):1390-1397
31. Wendelboe AM, Njamkepo E., Teyssou R, Guiso N., Van Rie A. for the Infant Pertussis Study Group. Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. **Pediatr Infect Dis J.** (2007) 26:293-299
32. Hallander H, Advani A, Riffelmann M, von Konig CH, Caro V., Guiso N., Mooi FR, Gzyl A, Kaltoft MS, Fry NK, Mertsola J, He Q. *Bordetella pertussis* strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **J. Clin Microbiol** (2007) 45(10):3257-3262
33. Tejiokem MC, Gouandjika I, Beniguel L, Endegue Zanga MC, TENE G, GODY JC, Njamkepo E et al. HIV-Infected Children Living in Central Africa Have Low Persistence of Antibodies to Vaccines Used in the Expanded Program on Immunization. **PLoS ONE.** (2007) 2: e1260
34. Bonmarin I, Levy-Bruhl D, Baron S, Guiso N., Njamkepo E., Caro V. Pertussis surveillance in French hospitals: results from a 10 year period. **Euro Surveill** 2007, n°12 (1) Disponible en ligne: <http://www.eurosurveillance.org/em/v12n01/1201-226.asp>

2008

35. Guiso N. *Bordetella pertussis* polymorphism and pertussis vaccine (Letter to the Editor). **Clin Vaccine Immunol** (2008) 15(2):394-395
36. Duclos A, Bouhour D, Baptiste C, Launay O, Guiso N and the Avancées Vaccinales Experts Group. Assessment of individual vaccine status in a vaccinology experts' group. **J. Eval. Clin. Practice** (2008) 14:610-614
37. Andre P, Caro V., Njamkepo E, Wendelboe AM, Van RIE A, Guiso N. Comparison of serological and Real-Time PCR Assays to diagnose *Bordetella pertussis* infection. **J. Clin Microbiol** (2008) 46(5): 1672-1677
38. Guiso N, De La Rocque F, Njamkepo E, Lecuyer A, Levy C, Romain O, Thollot F, Abitbol V, Soubeyrand B, Cohen R and the French pediatric group ACTIV and AFPA. Pertussis surveillance in Private Pediatric Practices, France, 2002-2006. **Emerg. Inf. Dis.** (2008) 14(7): 1159-1161
39. Bouchez V, Caro V, Levillain E, Guigon G, Guiso N. Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. **PLOS ONE** (2008) 3(6): e2437
40. Caro V, Bouchez V, Guiso N. Is the sequenced *Bordetella pertussis* strain Tohama I representative of the species? **J. Clin Microbiol** (2008) 46(6): 2125-2128
41. Bidet P, Ligori S, De Lauzanne A, Caro V, Lorot M, Carol A, Faye A, Guiso N, Bingen E, Bonacorsi S. Real-Time PCR Measurement *Bordetella pertussis* DNA in Nasopharyngeal Secretions During Antibiotic Treatment of Young Children with Pertussis. **J. Clin Microbiol** (2008) 46(11): 3636-3638
42. Njamkepo E, Cantinelli T, Guigon G, Guiso N. Genomic analysis and comparison of *Bordetella pertussis* isolates circulating in low and high vaccine coverage areas. **Microb Infec** (2008) 10:1582-1586

2009

43. Tondella ML, Carlone GM, Messonnier N, Quinn CP, Meade B, Burns DL, Cherry JD, Hewlett EL, Edwards KM, Xing D, Giammanco A, Wirsing von Konig CH, Han L, Guiso N, Hueston L, Robbins JB, Powell M, Mink Cam, Poolman JT, Lynn F, Hildreth S, Morris A. International *Bordetella pertussis* assay standardization and harmonization meeting report. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States, 19-20 July 2007. **Vaccine** (2009) 27:803-814
44. Beytout J., Launay O., Guiso N., Fiquet A., Baudin M., Richard P., Baptiste C., Soubeyrand B. Safety of Tdap-IPV given 1 month after Td-IPV booster in healthy young adults. A placebo-controlled trial. **Hum Vaccin.** (2009) 5(5) : 315-321
45. Tejiokem MC., Njamkepo E., Gouandjika I, Rousset D. Beniguel L., Bilong C., Tene G., Penda I., Ngongueu C., Gody JC., Guiso N., Baril L.. Whole-cell pertussis vaccine induces low antibody responses in HIV-infected children living in sub-Saharan Africa. **Clin Vaccine Immunol** (2009) 16(4) : 479-483

46. Launay O, Toneatti C, Bernede C, Njamkepo E, Petitprez K, Leblond A, Larnaudie S, Goujon C, Ungeheuer MN, Ajana F, Raccurt C, Beytout J, Chidiac C, Bouhour D, Guillemot D, Guiso N. Antibodies to tetanus, diphtheria and pertussis among healthy adults vaccinated according to the French vaccination recommendations **Hum Vaccin** (2009): 5(5) 341-346
47. Belmin J, Bouree P, Camus D, Guiso N, Jeandel C, Trivalle C, Veyssier P. Educational vaccine tools: the French initiative. **Aging Clin Exp Res**, (2009) 21(3):250-253
48. Chenal-Francisque V, Caro V, Boursaux-Eude C, Guiso N. Genomic analysis of the Adenylate cyclase-hemolysin C-terminal region of *Bordetella pertussis*, *parapertussis* and *bronchiseptica*. **Res Microbiol** (2009): 160:330-336
49. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. **Vaccine** (2009) 27:6034-6041
50. Caro V, Guiso N, Alberti C, Liguori S, Buruoca C, Couetdic G, Doucet-Populaire F, Ferroni A, Papin-Gibaud S, Grattard F, Reglier-Poupet H, Raymond J, Soler C, Bouchet S, Charreau S, Couzon B, Leymarie I, Tavares N, Choux M, Bingen E, Bonacorsi S. Proficiency program for Real-Time PCR Diagnosis of *Bordetella pertussis* Infections in French Hospital laboratories and at the French National reference center for Whooping Cough and other Bordetellosis. **J Clin Microbiol**. (2009) 47:(10)3197-3203
51. Guiso N. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccine. **Clin Infect Dis** (2009) 49:1565-1569

2010

52. Larnaudie s, Guiso N, Baptiste C., Desaint C., Deforges L., Lebon P., Soubeyrand B., Launay O. Humoral immunity of dTdap-IPV vaccine (REPEVAX[®]) administered 1 Month after dT-IPV (REVAXIS[®]) in Adults with Unknown Vaccination History **Hum Vaccin** (2010) 6 (10): 1-6
53. Wu Y, Raymond B, Goosens P, Njamkepo E, Guiso N, Paya M, Touqui L. Type-IIA secreted phospholipase A2 is an endogenous antibiotic-like protein of the host. **Biochimie** (2010) 92:583-587
54. Lasserre A, Tison C, Turbelin C, Arena C, Guiso N, Blanchon T. Pertussis prevention and diagnosis practices for adolescents and adults among a national sample of French general practitioners **Preventive Medicine** (2010) 51:90-91
55. Berger F., Njamkepo E, Minaberry S., Mayet A., Haus-Cheymol R., Verret C., Massit B., Guiso N, Spiegel a. Investigation on a pertussis outbreak in a military school: risk factors and approach to vaccine efficacy. **Vaccine** (2010) 28:5147-5152
56. Bouchez V, Brun D, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. *Bordetella parapertussis* isolates not expressing pertactin circulating in France **Clin Microbiol Infect** (2010) 10.1111/j.1469-0691.2010.03303.x

57. Panagopoulos M. I., Saint-Jean M., Brun D., Guiso N., Bekal S., Ovetchkine P., Tapiero B. *Bordetella holmesii* bacteremia in asplenic children: Report of 1 four cases initially 2 misidentified as *Acinetobacter lwoffii* **J. Clin. Microbiol** (2010) 48(10) 3762-3764

58. Kurova N., Njamkepo E., Brun D., Tseneva G., Guiso N. Monitoring of *Bordetella* isolates circulating in Saint Petersburg, Russia between 2001 and 2009. **Res Microbiol** (2010) 161:810-815

2011

59. Guiso N., Berbers G., Fry N.K., He Q., Riffelmann M., Wirsing von Konig C. H. and the EUPertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** (2011) 30(3):307-12

60. Guiso N., Wirsing von Konig C.H., Forsyth K., Tan T., Plotkin S.A. The Global Pertussis Initiative: Report from a round table meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 janvier 2010. **Vaccine** (2011) 29:1115-1121

61. Le Coustumier A., Njamkepo E., Cattoir V., Guillot S., Guiso N. Human *Bordetella pertussis* infection and long-lasting persistence inside the host. **Emerg Inf Dis** 17(4):612-618

62. Caroff M. Structural modifications occurring in lipid A of *Bordetella bronchiseptica* clinical isolates as demonstrated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (2011) **Mass spectrometry** 25:1075:1081

E.3 Communications nationales (toutes sur invitation)

2006

Guiso N. "La coqueluche, hier, aujourd'hui, demain" Conférence "5 à 7" Institut Pasteur de Lille, Lille, 17 janvier 2006

Guiso N. "Vers une stratégie optimale vaccination contre la coqueluche" 10èmes rencontres pédiatrie, Paris, 27-28 janvier 2006

Guiso N. "Résurgence et transmission de la coqueluche en France" Actualité et conséquences pratiques en vaccinologie, Institut Pasteur de Paris, Paris 25 mars 2006

Guiso N. "Coqueluche en France" XXXV Assises Nationales des Sages Femmes, Strasbourg, France 11 mai 2006

Caro V. "Coqueluche en France" XXXVI Assises Nationales des Sages Femmes, Biarritz, France 27 octobre 2006

2007

Guiso N. *Bordetella Pertussis*, toujours aussi fascinante 100 ans après sa découverte, Orsay le 15 octobre 2007

Guiso N. : Coqueluche et Bordetelloses, Orsay le 20 décembre 2007

Guiso N. Atelier Pratique Médical : Epidémiologie de la coqueluche, ré-émergence d'une maladie oubliée, Medec, Palais des Congrès, Paris, le 15 mars 2007

Guiso N. : "La coqueluche en 2007 : épidémiologie et prévention vaccinale", et "Surveillance et perspective", Nantes le 24 mai 2007

Guiso N. : "la coqueluche en 2007, maladie oubliée mais toujours très présente" dans le cadre du Congrès Périnatalité, Palais des Congrès du Parc Chanut, Marseille le 18 octobre 2007

Guiso N. : "la coqueluche en 2007, comment la reconnaître, la prévenir, la traiter ?" dans le cadre de la 18^{ème} journée Médicale de Cochin, Paris le 17 novembre 2007

Guiso N. : "la coqueluche en 2007, pourquoi faut-il toujours y penser ?" dans le cadre des 6èmes journées Nationales de Médecine Générale, CNIT de la Défense, Paris le 23 novembre 2007

Guiso N. : "la coqueluche en 2007, maladie oubliée mais toujours très présente" dans le cadre de la VII^{ème} Journée d'Hygiène Hospitalière, Nantes le 4 décembre 2007

Guiso N. : " Aspects particuliers du diagnostic de la coqueluche en 2007 : du nourrisson à l'adulte" dans le cadre des 41èmes journées de biologie praticienne, Maison de la Chimie, Paris, le 7 décembre 2007

Caro V et al : Communication orale : Quelles approches pour l'étude de l'évolution de *bordetella pertussis* dans différents écosystèmes ? SFM, VII^{ème} Congrès National Nantes, France le 31 mai 2007

Caro V et al : communication orale : Mise en place d'un contrôle qualité du diagnostic de la coqueluche par PCR en temps réel dans le cadre du programme ministériel de soutien aux techniques Innovantes et coûteuses (Etudes Diamocoq STIC n° IC050870) RICAI au palais des congrès Paris France, le 7 décembre 2007

Bouchez V : Communication orale : Evolution de *Bordetella pertussis* en fonction de l'environnement, Orsay France le 20 décembre 2007

Guillot S : Communication orale : Evolution d'une Bordetelle chez son hôte. Institut Pasteur, Paris France le 8 octobre 2007

Guillot S : Communication orale : Peut-il y avoir émergence d'une troisième espèce de Bordetelle pathogène pour l'homme ? Orsay France le 20 décembre 2007

2008

Guiso N. : Conférence "Après la coqueluche de l'adolescent, la coqueluche de l'adulte" auprès des professionnels de santé (cliniciens, médecins) :hôpital Necker Paris (22.01.08) ; Tours (05.02.08) ; Bordeaux (02.04.08) ; Clamart (21.05.08) ; Paris (27.05.08 et 10.06.08) ; Pontoise (03.06.08) ; Clermont-Ferrand (08.10.08)

Rosso ML : "Confirmation de la coqueluche aujourd'hui : évolution des outils du diagnostic", RICAI, Paris (4-5.12.08)

Bouchez V : "Evolution de la population de *Bordetella pertussis* dans différents écosystèmes", GDR Combavir, (19.12.2008), Orsay

2009

Guiso N. : Conférence "Toux chez l'adulte, ne pas oublier la coqueluche !" 14^{ème} entretiens de RAMBAM France le 18 janvier 2009, Paris

Guiso N. : Conférence de presse "questions pour un expert" débat sur la coqueluche le 2 mars 2009, Boulogne-Billancourt

Guiso N. : Conférence "les vaccins ne sont pas que pour les enfants" Mystères de la science biomédicale le 3 mars 2009, Paris

Guiso N. : Conférence "Conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de coqueluche" auprès du réseau des hygiénistes de Centre RHC Arlin, 24 mars 2009, Blois

Guiso N. : Conférence "La coqueluche n'est pas qu'une maladie pédiatrique" auprès des professionnels de santé (cliniciens, médecins) : Rennes (21.01.09) ; Toulouse (11.02.09) ; Douai (09.07.09) ; Strasbourg (15.09.09) ; Paris (22.09.09) ; Marseille (20.10.09) ; Bordeaux (24.11.09)

Guiso N. : Conférence "Epidémiologie et prévention de la coqueluche" 14^{ème} colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses (CEMI) 14.12.09 Institut Pasteur, Paris

Guillot S. : "Evolution d'espèces bactériennes sous pression vaccinale", GDR3048 "Combavir", (11.12.2009), Institut Pasteur, Paris

Deux affiches "Evaluation de pratique vaccinale : immunogénicité du vaccin REPEVAX® (dTPca) administré 1 mois après un vaccin REVAXIS® (dTP) chez des adultes sans antécédents vaccinaux connus" ; Biological diagnosis of *bordetella* species by real-time PCR. 29^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI) (3-4.12.09) Paris

Une affiche "Incidence de la coqueluche en Ile-de-France en médecine générale, 2008-2009" (CEMI) 14.12.09 Paris.

2010

Guiso N. : Conférence "La coqueluche n'est pas qu'une maladie pédiatrique" auprès des professionnels de santé (cliniciens, médecins) (26/01/2010) Lyon France ; (16/09/2010) Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Paris ; (09/11/2010) Hôpital Necker, Paris) ; (23/11/2010) Groupement des pédiatres du Val de Seine, Mantes la Jolie ; (16/12/2010) Paris.

Guiso N. : Conférence "Vacciner les adultes pour protéger les nouveau-nés" (18/02/2010) Mantes la Jolie France et le 20 avril 2010 à Limoges, France

Guiso N. : Conférence "Coqueluche en entreprise" (25/11/2010) organisée par les Laboratoire Alpha (Biologie et médecine du Travail) à Paris.

Deux affiches "Evolution des espèces bactériennes du genre *Bordetella* en fonction du type de vaccin coquelucheux et de la stratégie vaccinale" ; "Etude collaborative entre le CNR de la coqueluche et des laboratoires hospitaliers (RENACOQ) et privés (LAm) afin d'évaluer la PCR en temps réel pour la détection du matériel génétique de *Bordetella*". 29^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI) (2-3/12/2010) Paris

E.4 Communications internationales (toutes sur invitation)

2006

Guiso N. "Pertussis vaccine in perspective" 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (16th ECCMID), Nice, France, 2-4 avril 2006

Guiso N. "Current situation of pertussis in 2006" 4th arab symposium for antimicrobial agents and 16th national congress of Infectiology, Tunis, Tunisia 18-20 avril 2006

Organisateur / Eighth International Symposium, Saga of the Genus Bordetella:

Guiso N. "Historical view of the disease". Eighth International Symposium, Saga of the Genus *Bordetella*, 1906-2006, Paris, France 7-10 novembre 2006

Guiso N. "Bordetelloses other than pertussis". Eighth International Symposium, Saga of the Genus *Bordetella*, 1906-2006, Paris, France 7-10 novembre 2006

Caro V. "Validation and inter-laboratory comparison of a murine *Bordetella pertussis* intranasal challenge model". Eighth International Symposium, Saga of the Genus *Bordetella*, 1906-2006, Paris, France 7-10 novembre 2006

Guiso N. "5th Whooping cough vaccine" 17th Immunisation Conference for Health Care Workers Manchester, United Kingdom, 1^{er} Decembre 2006

2007

Guiso N. : Conférence donnée dans le cadre du congrès EUpertstrain "Pertussis surveillance in France : from PFGE to microarrays" Turku, Finlande le 4 juin 2007

Guiso N. : Conférences dans le cadre de Global Pertussis Initiative "Household Transmission of Pertussis ET 501, Study update", "Pertussis in France" et "*Bordetella pertussis* population around the world: from bacteriology to DNA microarrays" Prague, Czech Republic du 6 au 8 décembre 2007

2008

Guiso N. "Pertussis in children, adolescents and adults: mutual protection by mutual vaccination" 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) (20 - 22.04.2008), Barcelona, Spain

Guiso N. "Pertussis epidemiology in France: Impact of vaccine boosters" EU-Pertgenomics/EU-Pertstrain meeting, (12 - 13.06.2008) Copenhagen and Helsingor, Denmark

"Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the example of Pertussis" Cambridge Bordetella workshop, (22 - 26.07.2008) Cambridge, England

Guiso N. "Surveillance of vaccine preventable diseases (SURVAC project)", Ministère des Affaires Etrangères et Européennes, (17 - 19.09.2008) Saint Petersburg, Russia

Guiso N. "Consequences of vaccination on the agent of the disease and the biological diagnoses" Consensus on pertussis booster vaccination in Europe (C.O.P.E) (5 - 6.10.2008) Frankfurt, Germany

Guiso N. "Studies of transmission and Pertussis surveillance in France" Pertussis workshop in Sweden, (17 - 19.11.2008) Stockholm, Sweden

Guiso N. "Household transmission of pertussis - Who infects young infants?", "*Bordetella pertussis* population evolution - Influence of herd immunity", Global pertussis initiative (GPI) roundtable meeting, (4 - 12.12.2008) San Jose, Costa Rica

2009

Guiso N : "Diagnosis of pertussis current practices and future developments" Consensus on pertussis booster vaccination in Europe (C.O.P.E) (02-03.02.2009), Vienna, Austria

Guiso N "Optimising vaccination strategy for pertussis control throughout life" 27th annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) (9 juin 2009), Bruxelles Belgique.

Guiso N "Interchangeability of pertussis vaccines" SAGE working groupe, Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (1-3.09.2009) Genève, Suisse

Njamkepo E. : "Vaccine strategy and *Bordetella pertussis*" EU-Pertgenomics/EU-Pertstrain meeting, (04 - 06.05.2009) Rome, Italy

2010

Guiso N : "pertussis surveillance in France" and "Diagnosis of pertussis : current practices and future developments" dans le cadre de "Global pertussis Initiative" (10-12 janvier 2010) Paris, France

Guiso N : "Cocooning (maternal and family/household vaccination" SAGE working groupe, Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (15-16.02.2010) Genève, Suisse

Guiso N : "Pertussis surveillance and testing: recommendations from the GPI", "what about the circulating isolates?", "Pertussis in France" 4th Global pertussis initiative, Regional roundtable meeting (14-15 avril 2010) Paris, France

Guiso N : "Pertussis in France", "Pertussis in adolescents, Impact of booster vaccination" Persistence of pertussis natural and vaccine immunity", "Pertussis surveillance: current and future concepts for pertussis diagnosis" Consensus On Pertussis booster vaccination - Experts (C.O.P. E) (27-28 avril 2010), Barcelone, Espagne

Guiso N : "Hot topics in pertussis in 2010" European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) (4-8 mai), Nice, France

Guiso N : "Novelties about human *Bordetella* species"; "Epidemiology and diagnosis" Ninth International *Bordetella* Symposium, (30 septembre au 3 octobre 2010) Baltimore USA

Six affiches : "Human *Bordetella petrii* infection and persistence inside the host" ; "*Bordetella* and *mycoplasma pneumoniae* mixed infections" ; "Persistence and evolution of *Bordetella bronchiseptica* in its human host" ; "Does the expression of *Bordetella pertussis* virulence change according to the environment ?" ; "Influence of pertussis whole-cell or acellular vaccine-induced immunity on *Bordetella pertussis* species" ; "*Bordetella holmesii* infections in France" ; Ninth International *Bordetella* Symposium, (30 septembre au 3 octobre 2010) Baltimore USA

Guiso N : "Cocooning (maternal and family/household vaccination)" ; "Persistence of pertussis natural and vaccine immunity" ; "Pertussis surveillance: current and future concepts for pertussis diagnosis" ; "Pertussis – a global perspective" ; "Why France changed its vaccine strategy" symposium Vaccinology 25-26 octobre 2010 Johannesburg et Hermanus, Afrique du Sud

Guiso N : "*Bordetella pertussis* polymorphisms and vaccine" European Academy of Paediatrics, 10 décembre 2010, Bruxelles, Belgique

Guillot S : "Last news from *B. pertussis* and *B. parapertussis* isolates collected in France" EUPERTstrain (09-10 juin), Bilthoven Pays-Bas

E.5 Enseignements de janvier 2006 à décembre 2010

2006

Nicole GUISO

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Evolution de l'épidémiologie de la coqueluche en fonction de la vaccination" Institut Pasteur – le 09 février 2006 (3 heures)

Dans le cadre d'un enseignement post-universitaire : « la coqueluche : prévention et diagnostics » Hôpital Necker- le 26 janvier 2006 (1heure)

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Microbiologie générale" Présentation "Le genre *Bordetella*, pourquoi faut-il toujours parler de lui en 2006 ?" Institut Pasteur - le 12 septembre 2006 (3 heures)

Valérie CARO

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud sur "Vaccin anti-coquelucheux" – Présentation "Nouveautés du côté de *B. pertussis* et des vaccins coquelucheux" Chatenay Malabry - octobre 2006 (3 heures)

2007

Nicole Guiso

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Evolution de l'épidémiologie de la coqueluche en fonction de la vaccination" Institut Pasteur – le 15 février 2007 (3 heures)

Dans le cadre du cours de Bactériologie Médicale : présentation Le genre "*Bordetella*" Cours et démonstration. Institut Pasteur - le 8 mars 2007 (3 heures)

Dans le cadre du cours International Francophone de Vaccinologie : présentation "La vaccination coquelucheuse : conséquences de cinquante années de vaccination" Ecole du Val de Grâce - le 7 juin 2007 (1h30)

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2007 : présentation " Les bordetelles : pathogénicité, épidémiologie et prévention" Institut Pasteur le 6 septembre 2007 (1h30)

Jusqu'en juin 2007 nous avons poursuivi la formation de Marie-Paule Bourgeois dans le cadre de sa formation professionnelle au CNAM pour l'obtention d'un diplôme d'ingénieur.

Valérie Caro

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud –
Présentation "Nouveautés du côté de *B. pertussis* et des vaccins coquelucheux"
Chatenay Malabry - octobre 2007 (3 heures)

2008

Nicole Guiso

Dans le cadre de l'École Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Evolution de l'épidémiologie de la coqueluche en fonction de la vaccination"
Institut Pasteur – le 12 février 2008 (3 heures)

Dans le cadre du cours de Vaccinology : "Impact on epidemiology: the example of *B. pertussis*"
Institut Pasteur - le 4 avril 2008 (1h30)

Dans le cadre du cours International Francophone de Vaccinologie : présentation "La vaccination coquelucheuse : conséquences de cinquante années de vaccination"
Ecole du Val de Grâce - le 5 juin 2008 (1h15)

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2008 : présentation " Les bordetelles : pathogénicité, épidémiologie et prévention"
Institut Pasteur - le 10 septembre 2008 (1h30)

Marie-Laure ROSSO

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud –
Présentation "Nouveautés du côté de *B. pertussis* et des vaccins coquelucheux"
Chatenay Malabry - le 15 octobre 2008 (3 heures)

2009

Nicole Guiso

Dans le cadre de l'École Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses"
Institut Pasteur – le 9 février 2009 (3 heures)

Dans le cadre du cours de bactériologie Médicale : Le genre "Bordetella" - Institut Pasteur - 5 mars 2009 (3 heures)

Dans le cadre du cours International Francophone de Vaccinologie : présentation "La vaccination coquelucheuse : conséquences de cinquante années de vaccination"
Ecole du Val de Grâce - le 12 mars 2009 (1h15)

Dans le cadre du cours Pasteur-CNAM School of Public Health, Cours de Vaccinologie : "Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the example of pertussis"
Institut Pasteur - le 31 mars 2009 (1h30)

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2009 : présentation " Les bordetelles : pathogénicité et épidémiologie"
Institut Pasteur - le 8 septembre 2009 (1h30)

Marie-Laure Rosso

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud –
Présentation "Nouveautés du côté de *B. pertussis* et des vaccins coquelucheux"
Chatenay Malabry - le 15 octobre 2009 (3 heures)

2010

Nicole Guiso

Dans le cadre de l'École Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses"
Institut Pasteur – le 9 février 2010 (3 heures)

Dans le cadre du cours International Francophone de Vaccinologie : présentation "La vaccination coquelucheuse et ses conséquences "
Ecole du Val de Grâce - le 17 mars 2010 (1h15)

Dans le cadre du cours Pasteur-CNAM School of Public Health, Cours de Vaccinologie : "Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the example of Pertussis and Diphtheria"
Institut Pasteur - le 30 mars 2010 (1h30)

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2010 : présentation " Le genre *Bordetella* : composition et évolution en fonction de la vaccination"
Institut Pasteur - le 07 septembre 2010 (1h30)

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud –
Présentation "*B. pertussis* et les vaccins coquelucheux"
Chatenay Malabry - le 28 octobre 2010 (3 heures)

E.6 Expertises

2006

OMS : Nicole GUIISO a été invitée comme expert par l'OMS pour la rédaction de "Standardisation and control of acellular pertussis vaccines", Report of a meeting held on 16-17 March 2006, St Albans, Royaume Uni"

AFSSAPS : Nous avons transféré à l'AFSSAPS la technique du modèle murin d'infection intra nasale. Ce modèle mis au point et utilisé par l'unité de recherche depuis plusieurs années, a en effet, été choisi comme un des tests de contrôle des vaccins acellulaires par l'OMS suite à plusieurs études collaboratives coordonnées par l'OMS et le NIBSC.

2007

Serum Institute of India : Nicole GUIISO a été invitée comme expert par le Serum Institute of India à Pune du 16 au 19 avril 2007 dans le cadre d'une réunion concernant "**Whooping cough vaccines in 2007: Epidemiology, Prevention, Surveillance and Diagnoses**".

CDC : Nicole GUIISO a été invitée comme expert par le CDC à Atlanta du 19 au 20 juillet 2007 dans le cadre d'une réunion concernant « **Bordetella pertussis assay harmonization and standardization – International Meeting Report Centers for Disease Control and Prevention** ». Nicole Guiso a fait deux présentations concernant "Pertussis in France" et "Pertussis serodiagnosis". Un manuscrit est en cours de rédaction faisant la synthèse des communications.

2008

Nicole Guiso a participé aux réunions du groupe de travail du Comité technique des Vaccinations pour la rédaction des recommandations concernant le diagnostic biologique de la coqueluche (http://www.hcsp.fr/hcspi/docspdf/avisrapports/hcspa20080905_coqueluche.pdf) et les recommandations sur la conduite à tenir concernant un cas de coqueluche (http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/hcspr20080905_coqueluche.pdf)

2009

Nicole Guiso a participé aux groupes de travail du CTV sur la stratégie vaccinale coquelucheuse et du comité SAGE de l'OMS pour la préparation d'une nouvelle version des recommandations.

2010

Nicole Guiso a participé aux groupes de travail du CTV sur la stratégie vaccinale coquelucheuse et du comité SAGE de l'OMS pour la préparation d'une nouvelle version des recommandations.

E.7 Collaborations

L'unité de Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines collabore avec des unités de recherche à l'Institut Pasteur à Paris et de Lille ; des Instituts Pasteur du Réseau International (Saint-Petersbourg, Alger, Tunis, Bucarest) ; des laboratoires européens en Allemagne, Finlande, Italie, Pays-Bas, Pologne, Royaume-Uni, Suède, République Tchèque ; des laboratoires Américains, Australiens, Canadiens, Japonais, Sud-africains.

DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITES
MISES EN OEUVRE

F Description des démarches qualité mises en œuvre au sein du CNR

De 2008 à aujourd'hui, en réponse aux inspections AFSSAPS relatives à la conformité aux exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux micro-organismes et toxines, une démarche d'harmonisation des systèmes de management qualité des CNR, a été réalisée.

Une politique Qualité, Sécurité, Environnement pour l'Institut Pasteur a été formalisée, validée par la Direction Générale et communiquée à l'ensemble du personnel en 2008 et mise à jour en 2011.

En septembre 2010, un état des lieux des dispositions qualité des CNR et des services supports de l'Institut assurant un appui efficace et maîtrisé aux CNR a été formalisé.

En effet, dans le cadre des démarches qualité des CNR et d'autres entités, plusieurs services supports (pôle Equipement, RH, logistique, QSE, Prévention des risques,...) ont mis en place des dispositions qualité permettant de répondre aux exigences des référentiels qualité (ISO 9001, ISO 17025, ISO 15189,...) mis en place à l'Institut Pasteur.

Plus particulièrement, la Direction déléguée Environnement-Sécurité-Logistique (ESL) a formalisé et mis à disposition des CNR les procédures qualité d'organisation, de pilotage et d'amélioration nécessaires dans le cadre des démarches selon les référentiels ISO. Elle apporte également ses ressources et son expertise pour accompagner les CNR dans leur projet d'accréditation partielle (envoi des actes de candidatures pour l'accréditation avant le 31/10/2012 et obtention de l'accréditation partielle avant le 31 mai 2013) et complète (avant le 1/11/2016) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

Un manuel qualité des CNR a été rédigé et a pour objectif la description du système de management de la qualité commun à l'ensemble des CNR.

Avancement de l'Assurance Qualité sur le CNR Coqueluche-autres bordetelloses

Le temps dédié au personnel du CNR pour la mise en place de l'assurance qualité et l'implication de l'équipe technique et de l'encadrement pour cette thématique a permis l'atteinte d'un niveau qualité très satisfaisant.

L'encadrement de cette structure a mis en œuvre, pour son personnel technique, les moyens nécessaires pour la mise en œuvre de la qualité pour les activités.

Cette organisation a permis la mise en place efficace d'une gestion documentaire de la qualité (procédures, modes opératoires et enregistrement) et d'une gestion du matériel, pour ses activités de diagnostic.

La gestion du matériel permet de garantir l'utilisation d'équipements fiables, appropriés aux besoins et surveillés en temps réel.

La gestion des réactifs et consommables (sélection et évaluation des fournisseurs, distribution et évaluation des produits) est assurée par le département Achats et le service Logistique.

La politique qualité de l'unité et du CNR est résumée ci-dessous. Des contrôles qualité intra et inter laboratoires sont régulièrement réalisés en ce qui concerne les techniques de diagnostics biologiques des bordetelloses. Chacune des techniques utilisées s'appuie sur un mode opératoire s'inscrivant dans le cadre d'une gestion électronique documentaire accessible que sur le portail **Webcampus** à tous les membres du CNR et de l'unité de recherche. Ces modes opératoires sont ré-actualisés régulièrement en fonction de l'évolution des techniques. Ils sont distribués aux laboratoires de bactériologie hospitaliers qui en font la demande.

L'ensemble des produits utilisés ainsi que sérums et antigènes de référence est colligé dans le logiciel **LabCollector**. Enfin, la métrologie de nos équipements est gérée par le logiciel **Océasoft**.

L'assurance qualité est gérée par l'unité de recherche, depuis la création du CNR en 1993.

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

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

- ▶ à ses missions de Centres nationaux 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 2010 :

- 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 continuera à être 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.
- Dans le cadre de ses missions de Centre National de Référence, l'unité continuera 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 continuera à optimiser l'organisation de son temps de travail via une planification 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.

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 2011

DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

G DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

Introduction sur le contexte

- Norme ISO15189 : Les LBM (laboratoires de biologie médicale) vont être tenus de mettre en place la norme ISO15189. Cette norme qui touche le laboratoire et son organisation a des impacts sur le système d'information.
- ASIP Santé (Agence des Systèmes d'Information Partagés de Santé) : L'ASIP Santé qui gouverne aujourd'hui tout le paysage des systèmes d'informations en santé impose des règles en matière de sécurité, de confidentialité et d'interopérabilité qui vont avoir à courts termes des conséquences non négligeables sur les outils informatiques utilisés par les CNR. On peut citer plusieurs points :
 - Agrément pour l'hébergement de données médicales à caractère personnel. EpiConcept a fait un dépôt de candidature pour obtenir cet agrément et a de fait acquis une expertise réelle sur ce sujet (sécurité, juridique, fonctionnel)
 - Accès aux informations via une authentification forte des utilisateurs (carte CPS ou CPA)
 - Respect d'un cadre d'interopérabilité pour les échanges de données médicales avec des tiers (InVS par exemple)

La capacité du candidat à mettre en œuvre la transmission régulière et automatisée de données vers l'InVS sera décrite.

Les solutions comme Lagon (application spécifique développée pour l'activité des CNR placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur par la société Epiconcept), Voozadoo, de par leur modularité, leur ouverture et les technologies utilisées permettent l'extraction et la transmission de données ou la mise à disposition de données sous les formes suivantes.

- En ligne : transmission via Voozadoo. L'InVS a accès à des informations agrégées via un compte dédié et sécurisé. La sécurisation des transferts est assurée par le serveur Web (protocole https)
- Extraction de données agrégées ou de fichiers à plat anonymisés (feuilles Excel, fichier texte, pdf...). Le niveau de sécurisation des transferts dépend de la nature des données (individuelles ou agrégées).
- Interopérabilité / Web services : les technologies utilisées dans Lagon ou Voozadoo (en particulier l'exploitation native de fichiers Xml) permettent une mise en place naturelle d'interfaces pour un transfert automatique et sécurisé de données standardisées. (Ce type d'architecture est similaire à celle mise en place pour les échanges avec l'ECDC pour alimenter la base TESSy – cf. machine to machine interface to TESSy. www.ecdc.europa.eu/.../0907_TER_TESSy_Web_Service_Technical_Documentation_1.pdf).

Le laboratoire détaillera les procédures visant au respect de la conformité à la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractères personnel ou les évolutions prévues.

- Authentification : nativement, l'authentification est individuelle (personne physique) et elle s'effectue par le biais de la saisie d'un identifiant et d'un mot de passe associé. En fonction des infrastructures, elle peut être renforcée par l'utilisation d'un LDAP (Système d'annuaire centralisé). Une interface d'administration permet à l'administrateur de gérer l'ensemble des utilisateurs (révocation, changement de mot de passe, création...)

- Droits des utilisateurs / Restriction des accès : une interface dédiée permet l'association d'actions et de droits à des groupes d'utilisateurs (personnel administratif, technicien, biologiste, administrateurs...).
- Traçabilité :
 - Journalisation des accès
 - Traçabilité de toutes les actions sur la base de données du type (QUI/QUOI/QUAND)
 - Traçabilité des modifications effectuées sur le logiciel et les ressources (versionning)
- Télémaintenance : **ce point qui dépend du CNR doit être repris à partir de la déclaration CNIL de celui-ci.**
- Sauvegarde et restauration : L'hébergement et la sauvegarde des serveurs Voozadoo et Lagon centralisés est assuré par les services informatiques de l'Institut Pasteur. En dehors d'indication particulière, ceux-ci sont sauvegardés avec une procédure classique :
 - dump quotidien des bases MySQL
 - sauvegarde complète une fois par mois conservée 1 mois.
 - sauvegarde différentielle une fois par jour, conservée 3 mois.

Le serveur est sauvegardé en une fois, pour tous les CNRs hébergés.

La sauvegarde se fait sur bande magnétique (LTO5) dans une robotique située de l'autre côté du campus par rapport à la salle serveur, pour assurer une conservation des données en cas d'incident majeur.

La sauvegarde se fait via le logiciel "Symantec NetBackup Enterprise Server 6.5"

1- Les traitements automatisés de données à caractère personnel mis en œuvre par les CNR dans leur cadre de leurs activités de surveillance et d'expertise :

Conformément aux dispositions de la loi du 6 juillet 1978 dite « Informatique et Libertés », l'Institut Pasteur a déclaré à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL)¹ les traitements de données personnelles ayant été mis en œuvre par chaque CNR dans le cadre de leurs activités d'expertise et de surveillance.

Cette déclaration comporte l'engagement que le traitement satisfait aux exigences de la loi notamment en ce qui concerne, les droits des personnes dont les échantillons et données collectées sont susceptibles d'être utilisés à des fins de recherche. A ce titre, l'Institut Pasteur a élaboré le document ci-joint. L'information et le consentement des personnes porte sur :

- le fait que les échantillons et données collectés puissent faire l'objet d'une transmission aux CNR pour une utilisation secondaire à des fins de recherche
- leurs droits d'information, d'opposition, d'accès et de rectification.

Les traitements répondent à la finalité principale suivante :

suivi et traitement des données relatives au matériel biologique (souches et prélèvements) reçu par le Centre National de Référence (CNR) dans le cadre de ses missions et conformément au cahier des charges, à des fins de caractérisation des souches et ou de diagnostic, et de surveillance épidémiologique. De la réception du matériel biologique jusqu'au rendu des résultats, les données permettent un suivi éventuel du patient et de phénomènes épidémiques.

¹ Déclaration Normale, Numéro de déclaration, Récépissé reçu de la CNIL en date du 19 janvier 2011



HOPITAL / LABORATOIRE EXPEDITEUR

Adresse complète ou cachet

Service :
 Médecin :
 Tél :
 Nom du Correspondant :
 Email :

PATIENT

Nom : Prénom :
 Date de naissance :/...../..... M F
 Ville de résidence
 Code postal : _____

PRELEVEMENT HUMAIN

N° d'origine de la souche expédiée :

Date du prélèvement :/...../.....

Origine du prélèvement :	OUI	NON
Expectoration	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Naso-pharynx	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bronche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LCR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autre :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Technique de prélèvement :

Aspiration	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ecouvillonnage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lavage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Biopsie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autre :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

CONTEXTES CLINIQUES

.....

 Hospitalisation Oui Non

VACCINATION

Patient vacciné Oui Non
 Nombre de dose :
 Date de la dernière dose :/...../.....
 Type de vaccin :

TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE

Traitement avant prélèvement Oui Non
 Antibiotique administré :

BACTERIOLOGIE

Date de la culture envoyée :/...../.....

Milieu de culture :

- Bordet Gengou*
- Regan-Lowe*

Morphologie bactérienne :

Caractères biochimiques testés :

Orientation :

Le CNR exerce des missions de santé publique grâce au matériel biologique transmis et aux renseignements les accompagnant. Ces activités sont assumées à titre gracieux sous réserve du respect des modalités d'expédition des souches et de la fourniture des renseignements se référant à ces produits biologiques. Le directeur du CNR est seul juge de la finalité des actes qu'il effectue et de leur gratuité.

**Questionnaire à joindre pour tout envoi et à retourner au
 CNR de la Coqueluche et autres Bordetelloses
 INSTITUT PASTEUR
 25-28 Rue du Docteur Roux
 75724 PARIS Cedex 15**

Ne pas remplir

2- Les traitements automatisés de données à caractère personnel mis en œuvre par les CNR dans leur cadre de leurs activités de recherche :

En complément de leurs activités de surveillance et d'expertise, les CNR ont également une activité spécifique de recherche dont l'objectif est de faire progresser les connaissances sur les maladies infectieuses et notamment sur les microorganismes qui y sont associés.

Dans le cadre de leurs missions de recherche, les CNR respectent les dispositions du chapitre IX de la loi du 6 janvier 1978 telle que modifiée par la loi du 6 août 2004, relatif aux traitements automatisés de données à caractère personnel ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé, qui autorise, sous certaines conditions, les transmissions de données médicales nominatives entre professionnels de santé et organismes de recherche tout en définissant les droits des personnes concernées.

En application de ces dispositions, un avis du Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) et une autorisation de la CNIL sont requis.

L'Institut Pasteur a initié une démarche auprès du président du CCTIRS afin de mettre en place une procédure centralisée permettant d'informer et de recueillir l'avis du CCTIRS préalablement aux demandes d'autorisation auprès de la CNIL. L'Institut Pasteur est dans l'attente du retour du président du CCTIRS pour la mise en place effective de cette procédure.

L'ensemble des données renseignées sur le formulaire (ci-contre) accompagnant les isolats cliniques reçus au laboratoire est géré informatiquement par le logiciel Lagon (EpiConcept) ;

Enregistrer auprès de la CNIL pour la confidentialité **n° de déclaration 1474593 v 0**

**PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL
POUR LA PERIODE 2012-2016**

H PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2012-2016

H.1 Projets de recherche du CNR

Les projets qui vont être entrepris tiennent compte du cahier des charges fixé par l'InVS

H.1.1 La collection d'isolats cliniques

La poursuite de cette collection est possible grâce à l'aide des réseaux RENACOO, CBVHF et ACTIV. La collection des isolats est toujours très importante afin de surveiller la nature et l'évolution des isolats, et de poursuivre la constitution d'une banque de données unique, comme il a pu être constaté les années précédentes.

H.1.2 L'analyse des isolats de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella holmesii* et *Bordetella petrii*

Cette analyse sera poursuivie avec les techniques de référence, telles que le génotypage des gènes codant toxines et adhésines, l'immuno-empreinte et la technique ECP pour les espèces *pertussis*, *parapertussis*, *holmesii* et *petrii*. Toute particularité sera, comme auparavant analysée par l'unité de recherche.

Nous envisageons de mettre en place la technique de typage moléculaire dénommée MLVA (Multi-Locus Variable-Number of Tandem-Repeats Analysis) qui est une méthode d'analyse du polymorphisme associé aux répétitions en tandem. Elle présente de nombreux avantages, comme un pouvoir discriminant élevé et la possibilité d'être réalisée directement à partir des prélèvements. Cette technique, si elle est applicable et validée, pourrait être un outil intéressant dans le cas où la culture faite à partir d'un prélèvement biologique, dans lequel de l'ADN de Bordetelle a été détecté, est négative. L'extraction de l'ADN à partir du prélèvement pourrait être utilisée directement pour le typage moléculaire.

H.1.3 Le développement d'outils moléculaires pour différencier les espèces de Bordetelles

Les différentes espèces de bordetelles ont peu de caractères biochimiques ou bactériologiques. Pour cette raison, nous envisageons de développer et d'évaluer différentes techniques de génotypage basée sur l'analyse du gène *rpoB* mais aussi d'autres gènes tels *recA*, *ompA*, *ris A*, *tuf*, *rnpB*, *atpD* utilisés avec succès pour l'identification d'autres espèces bactériennes phylogénétiquement proches, afin de déterminer l'outil moléculaire le plus approprié pour identifier et différencier les espèces de Bordetelles. Une première utilisation a déjà été faite dans le cas de l'infection persistante par *B. petrii* ([§D.6.2.1](#)).

H.1.4 Diagnostic biologiques des Bordetelloses

La PCRtr a largement contribué à améliorer le diagnostic de la coqueluche et autres bordetelloses. A cette fin, différentes cibles sont utilisées pour le diagnostic moléculaire des bordetelles. Certaines sont spécifiques d'une espèce, comme c'est le cas pour le promoteur de la toxine de pertussis (ptxA-Pr) qui est spécifique de l'espèce *pertussis* et le gène *recA* qui est lui spécifique de l'espèce *holmesii*. Malheureusement, ces 2 cibles sont moins sensibles (environ 50 fois moins) que celles qui utilisent les séquences d'insertion (IS - présentes en plusieurs centaines de copies dans le chromosome bactérien). La cible IS481 permet la détection des espèces *pertussis* et *holmesii* mais aussi de *bronchiseptica* et l'IS1001 permet la détection de l'espèce *parapertussis* mais aussi quelquefois de l'espèce *bronchiseptica*. Ces deux cibles sont plus sensibles que PtxA-Pr ou *recA* mais elles ne sont pas spécifiques d'une espèce. Enfin, plus récemment le gène BP3385 a été décrit comme spécifique de l'espèce *pertussis* il a l'avantage d'être un peu plus sensible que ptxA-P dans nos conditions expérimentales. Cependant depuis peu une équipe américaine a publié une étude montrant que le

gène BP3385 n'était pas spécifique de l'espèce *pertussis* car il a aussi été détecté dans le génome de certains isolats de l'espèce *bronchiseptica*.

H.1.4.1 Analyse de la proportion d'infection à *Bordetella holmesii* parmi les bordetelloses diagnostiquées avec la technique de PCR en temps réel utilisée comme diagnostic biologique en France

B. holmesii, généralement décrite comme provoquant des bactériémies chez des patients aspléniques, peut aussi provoquer des infections respiratoires, comme nous l'avons encore constaté en 2008 et 2009 lors de deux cas d'infections respiratoires cliniquement diagnostiquées comme coqueluche, chez une jeune adulte et une adolescente. En raison de ces observations, mais aussi en raison du diagnostic moléculaire utilisé et maintenant remboursé depuis mars 2011 pour le diagnostic de la coqueluche, nous avons initié la détermination de la proportion d'infection à *B. holmesii* parmi les cas de bordetelloses. En effet, le diagnostic biologique recommandé est maintenant la PCRtr qui cible la séquence d'insertion IS 481. Or, cette séquence se trouve aussi sur le génome de *B. holmesii*. Le diagnostic biologique actuel est donc un diagnostic *Bordetella* et non *B. pertussis*. Pour déterminer la proportion des infections à *B. holmesii* nous allons rechercher la présence du matériel génétique spécifique de *B. holmesii* à l'aide de la PCRtr, que nous avons développée, dans les prélèvements "*Bordetella*" positifs à notre disposition.

H.1.4.2 Développement d'un outil biologique par PCR en temps réel des infections à *B. bronchiseptica*

Depuis plusieurs années nous essayons de mettre au point un tel diagnostic. Notre échec est dû au fait que les cibles choisies jusqu'à présent n'étaient pas présentes sur tous les isolats cliniques. Nous allons poursuivre notre investigation à ce niveau en analysant la portion promotrice d'un gène codant un des facteurs synthétisé par la plupart des isolats de *B. bronchiseptica*.

H.1.4.3 Amélioration de la sensibilité de la PCR en temps réel

Malgré le progrès considérable apporté par l'amplification génique en temps réel, nos efforts dans les années à venir vont se porter sur l'amélioration de la sensibilité de cet outil. En effet, les PCRtr qui sont spécifiques d'une espèce utilisent généralement une cible qui n'a qu'une copie par chromosome bactérien. L'expérience au sein du CNR a montré qu'il est difficile de détecter une faible quantité de bactéries dans ce cas de figure. Nous allons donc tenter, en particulier, de trouver des solutions techniques pour augmenter la sensibilité de la PCRtr de ptxA-tr qui est la seule spécifique de l'espèce *pertussis*.

H.1.5 Surveillance des bordetelloses à *Bordetella petrii*

B. petrii a, lors de sa découverte, été considérée comme une bactérie de l'environnement, pouvant se multiplier en conditions soit anaérobiques soit aérobiques. Or, depuis quelques années des infections humaines à *B. petrii* sont observées, la plupart du temps chez des sujets immuno-déprimés, en particulier, les patients atteints de mucoviscidose ou âgés. Ces infections n'avaient pas été identifiées auparavant en raison, peut être, de l'utilisation d'automates (confusion avec *Achromobacter*).

Suite à notre collaboration avec A. Le Coustumier qui a permis de mettre en évidence la capacité de cette espèce bactérienne à induire des infections persistantes chez l'homme, nous envisageons de poursuivre leurs analyses en collaborant avec le réseau Mucoviscidose du Sud Ouest de la France.

H.2 Projets de l'unité de recherche

H.2.1 Analyse spatio temporelle des isolats des espèces *pertussis* et *parapertussis* et de leurs antigènes

Depuis 1998, la France est un pays qui utilise des vaccins Ca. De plus, c'est un pays où plus de 80% des enfants ont maintenant deux rappels vaccinaux c'est-à-dire un pays où la couverture est élevée depuis très longtemps (rappel chez les adolescents recommandés depuis 1998). L'immunité de la population a donc

changé puisque les vaccins Ca ciblent maintenant la virulence de *B. pertussis* et non toute la bactérie comme les vaccins Ce. Depuis quelques années, nous observons que la proportion d'isolats de *B. pertussis* mais aussi de *B. parapertussis* n'exprimant pas un antigène vaccinal, la PRN, augmente. Ces isolats ne semblent pas moins virulents d'après les analyses que nous avons réalisées avec nos modèles cellulaires ou animal. Deux hypothèses peuvent être faites : soit la PRN est une protéine qui n'a pas de rôle dans la virulence des isolats et on observe à une adaptation des deux espèces à l'homme soit ces isolats expriment plus fortement une autre protéine qui n'est pas présente dans le vaccin.

Pour trancher entre ces deux hypothèses, nous envisageons plusieurs approches :

- Comparer la clinique des sujets infectés par des isolats exprimant ou n'exprimant pas la pertactine pour confirmer ou infirmer si des différences sont observées ;
- de poursuivre le développement de l'analyse protéomique. En particulier une nouvelle toxine a été mise en évidence, exprimée par *B. bronchiseptica*. Cette toxine responsable de la mort des cellules phagocytaires par nécrose est un effecteur du système de sécrétion de type III (SSTIII). Le gène codant cet effecteur, appelé *bteA*, est présent sur le chromosome de *B. pertussis*. Les gènes codant le SSTIII sont aussi présents mais ne sont pas exprimés en raison de mutations. L'ensemble du système est donc non fonctionnel. Toutes ces analyses ont été réalisées sur des isolats de l'ère pré-vaccinale et il nous semble important de vérifier si cela est toujours le cas pour les isolats de l'ère post-vaccinale actuelle. Pour ce faire il nous faudra purifier cet effecteur et obtenir des anticorps spécifiques afin d'analyser les isolats circulant actuels. Cet outil nous servira aussi pour les deux espèces bactériennes, *parapertussis* et *bronchiseptica* ;
- il nous semble aussi important d'analyser si l'expression des facteurs de virulence, qu'ils soient antigènes vaccinaux ou pas, a évolué temporellement entre l'ère pré et l'ère post-vaccinale. Pour cela les outils protéomiques ne peuvent être utilisés car non quantitatifs. Les outils transcriptomiques sont en cours de développement afin de répondre à cette question.

H.2.2 Analyse des isolats de l'espèce de *B. holmesii*

Comme résumé précédemment, nous avons observé une augmentation du nombre d'isolats *B. holmesii* envoyés au CNR ces dernières années. La majorité a été isolée d'hémocultures provenant de sujets immuno déprimés. Cependant, nous avons aussi reçus des isolats provenant de prélèvements respiratoires de sujets immuno-compétents et présentant des symptômes coqueluchoïdes. Nous envisageons

- une analyse génomique d'isolats soient invasifs soit respiratoires
- une analyse du protéome à l'aide de sérum des sujets infectés

H.2.3 Analyse des isolats de l'espèce de *B. bronchiseptica* induisant des infections persistantes

Nos objectifs concernant cette espèce bactérienne, qui est ne l'oublions pas à l'origine de deux espèces pathogènes pour l'homme, *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont les suivants :

- Entreprendre une analyse phylogénétique des isolats d'origine humaine de notre collection à l'aide de la technique du MLST. Suite à cette analyse d'essayer de corréler les données de phylogénie avec la clinique car nous avons le dossier clinique de la plupart de nos patients et l'expression des facteurs de virulence ;
- Poursuivre l'analyse du génome d'une série d'isolats à l'origine d'une infection persistante d'une part, et entreprendre l'analyse transcriptomique de plusieurs séries d'isolats à l'origine d'infection persistante, d'autre part. Ces analyses sont entreprises afin de savoir si les isolats persistants

évoluent tous de façon semblable chez leur hôte l'homme. Par ailleurs, à l'aide de nos modèles cellulaires, nous envisageons d'analyser si les isolats qui persistent chez l'homme ont des capacités invasives supérieures aux autres et surtout s'ils sont aptes à persister intracellulairement.

H.2.4 Analyse de la durée de l'immunité induite par les vaccins acellulaires

Nous allons poursuivre notre collaboration avec le réseau ACTIV afin de déterminer plus précisément la durée de l'immunité induite par les vaccins Ca, donnée d'importance pour adapter au mieux la stratégie vaccinale.

H.2.5 Détermination de l'incidence de la coqueluche chez les plus de cinquante ans

En collaboration avec des médecins généralistes répartis sur toute la France, installés dans des grandes villes ou en zone rurale, nous allons essayer de déterminer l'incidence de la maladie chez les plus de cinquante ans en suivant les recommandations en termes de diagnostic biologique.

ANNEXES

Annexe 1 : Affiche présentée le 2 décembre à la RICAI (Palais des Congrès, Paris)

Etude collaborative entre le CNR de la coqueluche et des laboratoires hospitaliers (RENACOQ) et privés (LAM) afin d'évaluer la PCR en temps réel pour la détection du matériel génétique de *Bordetella*

Sophie Guillot et Nicole Guiso
Centre National de Référence de la Coqueluche et autres Bordetelloses

Introduction : Une des missions primordiales du CNR est la surveillance des bordetelloses. Cette surveillance se fait à l'aide des bactériologistes hospitaliers du réseau Renacoq (44 laboratoires) et du Collège de Bactériologie et Virologie et Hygiène de France. La PCR en temps réel comme outil de diagnostic direct de la coqueluche est utilisée par la plus part de ces laboratoires. Un des moyens pour s'assurer de la qualité des données est d'organiser régulièrement des contrôles qualités (CQ). Notre CNR a proposé un tel CQ en 2010.

Objet de l'étude : Comparer et évaluer la sensibilité de la technique de PCR temps réel (PCRtr) utilisée par les laboratoires hospitaliers (réseau Renacoq et/ou CBVH) et privés (LAM) pour la détection du matériel génétique de bordetella. Pour cela des contrôles qualités ont été préparés par le CNR pour les 33 laboratoires intéressés de participer à cette collaboration. Les participants ont rempli un questionnaire afin que nous puissions répertorier les méthodes d'extraction, le ou les gènes ciblés, les méthodes d'amplification et de détection ainsi que les équipements. L'organisation de ce CQ avait aussi pour but de faire un point sur l'utilisation des kits commerciaux et le suivi des recommandations du groupe « Pertussis PCR consensus group » (Riffelmann et al JCM 2005 Vol 43, N°10, p4925-4929).

Méthode : Le CNR a préparé une série de 6 tubes contenant ou non de l'ADN de différentes espèces de Bordetella (CQ1 à CQ6). Après validation interne, les échantillons ont été distribués pour être ensuite envoyés aux 33 laboratoires participants. Chaque laboratoire a fait la PCR temps réel dans les conditions habituelles et envoyé les résultats au CNR.

TABLEAU 1 : Récapitulatif des méthodes et réactifs les plus utilisés par les participants du CQ

Réponses	Méthode d'extraction, %	Nb de cible, %	Thermocycleur en temps réel, %	Nb de cycles, %	Type de sonde	Kit Amplification	Vol. réactionnel	Utilisation d'UNG	Temps extraction	Temps positif	Fournisseur des amorces et sondes	Référence des amorces et sondes utilisées
29	28%	2,48%	31	30	30	30	30	30	20	30	20%	Riffelmann et al 2005, 60%
14%	1,42%	24%	40%	17%	17%	17%	17%	17%	17%	17%	17%	
10%	6,9%	16%	3%	7%	11%							
10%		10%			5%	30%						

Les kits commerciaux sont moins utilisés que les kits d'amplification génériques (type Roche ou ABI). Le plus utilisé est celui d'origine.

Plus de la moitié des laboratoires utilisant les amorces et sondes recommandées par le groupe consensus pertussis PCR

TABLEAU 2 : Résultats attendus du CQ

ADN	Résultat/Conclusion attendus
CQ1	Négatif / Absence d'ADN de Bordetella
CQ2	Sp. IS481 positif / Détection d'ADN de Bordetella (et si utilisation de ptxS1 : détection d'ADN de B. pertussis)
CQ3	Sp. IS1001 positif / Détection d'ADN de Bordetella pertussis ou holmesii (et si utilisation de IS1001 avec négatif)
CQ4	Négatif / Absence d'ADN de Bordetella
CQ5	Sp. IS481 positif / Détection d'ADN de Bordetella (et si utilisation de ptxS1 : détection d'ADN de B. pertussis)
CQ6	Sp. IS481 positif / Détection d'ADN de Bordetella (et si utilisation de ptxS1 : négatif et recA = positif détection de B. holmesii)

TABLEAU 3-1 : Utilisation d'1 cible (IS481)

labo code	CQ1		CQ2		CQ3		CQ4		CQ5		CQ6	
	Résultat	Ct										
2	A	-	B	20	A	-	A	-	B	25	B	19
3	B	-	B	7	B	-	B	-	B	7	B	7
7	A	-	B	24	C	37	C	40	B	27	B	21
11	C	18	B	14	B	-	B	-	B	22	B	15
12	A	-	B	20	A	-	A	-	B	25	B	20
14	A	-	B	24	A	-	A	-	B	20	B	24
15	A	-	B	21	A	-	A	-	B	28	B	21
18	A	-	B	32	A	-	A	-	B	38	B	32
19	A	-	B	20	A	-	A	-	B	30	B	31
23	A	-	B	31	A	-	A	-	B	35	B	22
29	A	-	B	18	A	-	A	-	B	25	B	19
30	B	-	B	23	B	-	B	-	B	27	B	22
31	A	-	B	21	A	-	A	-	B	27	B	21
33	B	-	B	17	B	-	B	-	B	28	B	17

TABLEAU 3-0 : Moyenne des Ct obtenus

	CQ2 (n=8)	CQ3 (n=8)	CQ5 (n=8)	CQ6 (n=8)
Concentration d'ADN	100 pg/µl	4pg/µl	100 fg/µl	100 pg/µl
Ct labo IP	22	25	28	23
Ecart de réponses (n)	n=10	n=17	n=10	n=10
Ct moyen	21	25	27	22
% de laboratoires avec le Ct moyen +/- 2	63%	65%	70%	53%
Ecart Ct	14 à 32	18 à 36	21 à 38	15 à 32

Les valeurs de Ct sont assez homogènes sauf pour les laboratoires n° 18 et 23 qui ont des valeurs de Ct plus élevées que l'ensemble des participants. A l'opposé, les laboratoires n° 9 et 11 ont des valeurs de Ct plus faibles que l'ensemble des participants. Ce qui explique les écarts des valeurs de Ct observés.

Résultats du CQ
Code A = résultat et conclusion correctes.
Code E = résultat correct mais conclusion incorrecte ou incomplète.
Code C = résultat incorrect

TABLEAU 3-3 : Utilisation de 3 cibles (IS481, IS1001 et ptxS1)

labo code	CQ1		CQ2		CQ3		CQ4		CQ5		CQ6	
	Résultat	Ct										
1	A	-	A	19	A	24	A	-	A	26	A	19
8	A	-	A	21	A	25	A	-	A	26	A	22
28	A	-	A	20	A	28	A	-	A	25	A	19

Les trois laboratoires ont donné les résultats et les conclusions correctes et par élimination B. holmesii dans le CQ6 mais sans identification réelle. En effet seule l'utilisation de la PCR-rt-rcA, spécifique de l'espèce B. holmesii, permet de conclure à l'identification de cette espèce

TABLEAU 3-2 : Utilisation de 2 cibles (IS481 et IS1001)

labo code	CQ1		CQ2		CQ3		CQ4		CQ5		CQ6	
	Résultat	Ct	Résultat	Ct	Résultat	Ct	Résultat	Ct	Résultat	Ct	Résultat	Ct
4	A	-	A	20	A	20	A	-	A	27	A	22
5	B	-	B	17/18	A	19	B	-	A	29	A	17
6	A	-	B	21	A	24	A	-	B	27	B	21
9	B	-	B	16	A	12	B	-	B	21	B	18
30	A	-	B	22	A	18	A	-	B	25	B	23
33	A	-	B	7	A	7	A	-	B	7	B	7
36	B	-	A	22	A	26	B	-	A	28	A	21
37	A	-	A	19	A	25	A	-	A	25	A	20
20	B	-	B	23	A	25	B	-	B	28	B	22
22	A	-	A	21	A	23	A	-	A	25	A	22
22	B	-	B	7	A	7	B	-	B	7	B	7
24	A	-	B	25	A	26	A	-	B	30	B	24
25	A	-	C	17/48	A	19	A	-	B	25	B	18
26	A	-	B	22	A	29	A	-	B	30	B	26
27	A	-	B	20	A	27	A	-	B	26	B	22
31	A	-	B	25	A	28	A	-	B	28	B	25

La majorité des laboratoires utilisant 1 ou 2 cibles a donné les résultats corrects mais la conclusion utilisée pour l'IS481 (en général : détection de Bordetella pertussis) n'est pas correcte. En effet l'IS481 n'est pas spécifique de B. pertussis et peut être détectée dans d'autres espèces comme Bordetella holmesii.

Un grand merci à :
F. Doucet-Populaire, N. Bourgeois, M. Debruyne, A. Ferroni, C. Burucua, Ch. Payan, G. Hery-Arnaud, J. Cottin, Ph. Lanotte, S.A. Gibaud, M. Vergnaud, B. Soullie, Ph. Lehours, J.L. Koeck, R. Bonnet, J.P. Romaszko, J. Delmas, M.F. Prere, A. Lecoustumer, N. Wilhelm, H. Chardon, J. Etienne, S. Boisset, F. Grattard, D. Raffinot, M. Levast, J.M. Schelfel, D. De briel, M. Buser, J.M. Duez, C. Alauzet, G. Couetdic, D. Marx, L. Brasme, C. Dechamps, V. Vernet-Garnier, M. Nouvellon, L. Lemeer, R. Courcol, M. Roussel, A.S. Deleplancque, B. Prevost, F. Eb, B. Maurice, S. Bonacorsi, Ch. Bigaillon, A. Merens, F. Garnier, A. Guigon, Ph. Leroy

Résultats/Conclusion : Les 33 laboratoires participants ont rendu leurs résultats et la plupart ont obtenu un résultat très satisfaisant ou satisfaisant. Néanmoins ce CQ a permis de souligner la nécessité d'une homogénéisation dans le rendu des résultats. En effet, la majorité des laboratoires qui utilisent l'IS481 comme cible, conclut à la détection d'ADN de Bordetella pertussis lorsque la PCRtr est positive. Or il a été montré que l'IS481 peut aussi être détectée dans d'autres espèces comme Bordetella holmesii. L'organisation de ce CQ aura permis de sensibiliser les laboratoires sur l'importance du rendu de conclusion aux cliniciens.

Annexe 2 : Affiche 370 présentée le 2 décembre à la RICAI (Palais des Congrès, Paris)

370



Evaluation de 5 kits commerciaux de PCR en temps réel pour la détection du matériel génétique de *Bordetella*

²Philippe Lanotte, ³Chloé Plouzeau-Jayle, ³Christophe Burucoa, ¹Carole Grélaud, ⁴Sophie Guillot, ⁴Nicole Guiso, ¹Fabien Garnier

¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges ;
²Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital Bretonneau - Centre Hospitalier Universitaire de Tours, Tours ;
³Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers ;
⁴Centre National de Référence de la Coqueluche et autres Bordetelloses, Institut Pasteur, Paris.



Introduction

La PCR temps réel est la technique la plus contributive au diagnostic de la coqueluche. Un grand nombre de laboratoires a développé des techniques « maison » de détection du matériel génétique de *Bordetella*. Plusieurs tests commerciaux sont maintenant disponibles mais n'ont jamais été évalués.

Objectif

Evaluer les performances de cinq kits commercialisés de détection du matériel génétique de *Bordetella* par PCR en temps réel :

- *Bordetella* Real-Time PCR® (Diagenode)
- *Bordetella* R-gene® (Argène)
- Simplexa® *Bordetella pertussis/parapertussis* (distribué par Eurobio)
- PCR temps réel *Bordetella pertussis*® (distribué par Bioadvance)
- SmartCycler *B. pertussis/B. parapertussis*® (Cepheid)

Matériel et Méthode

Les kits ont été comparés à une technique maison validée dans les 3 laboratoires par le Contrôle Qualité du CNR. Comme tous les kits testés, cette technique maison cible l'IS481. Elle utilise une détection de l'amplicon par une sonde Taqman à l'aide d'un SmartCycler.

Seuil de détection: gamme de dilutions d'un extrait d'ADN d'une suspension de *B. pertussis* souche Tohama (238 copies de l'IS481).

Sensibilité Spécificité : échantillons d'ADN extraits de 81 prélèvements naso-pharyngés de patients suspects de coqueluche (31 à Limoges, 27 à Tours et 23 à Poitiers). Les échantillons ont été testés dans leur centre d'origine pour la PCR maison et pour les 5 kits.

Extraction d'ADN : kit QIAamp DNA Mini® kit (Qiagen)

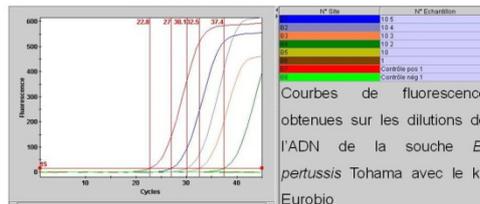
Thermocycleurs: Smart Cycler II® (Cepheid)

PCR temps réel maison : détection du gène *crpA* en sonde Taqman avec les primers *sBPr* (CCGAACCGGATTGAGAAAC), *sBPrf* (TAGGAAGGTCAATCGGCAT) et la sonde *BP* (CCGGCCGGATGAACACCCATAA)

Kits de détections par PCR en temps réel testés : *Bordetella* Real-Time PCR® (Diagenode), *Bordetella* R-gene® (Argène), Simplexa® *Bordetella pertussis/parapertussis* (Eurobio), PCR temps réel *Bordetella pertussis*® (Bioadvance) et SMART *B. pertussis/B. parapertussis*® (Cepheid). Les différents kits sont utilisés selon les recommandations des différents fabricants, notamment pour les seuil de fluorescence, 7 pour Bioadvance, 15 pour Eurobio et 30 pour les autres techniques.

Résultats

La PCR maison a détecté le matériel génétique de *Bordetella* dans 66 prélèvements parmi les 81 testés. Les 15 prélèvements négatifs en PCR maison ont été retrouvés négatif par tous les kits.



	PCR maison	Eurobio	Cepheid	Argène	Diagenode	Bio Advance
Seuil de détection (nombre de copies d'IS481 détectées)	100	100	100	100	1 000	10 000
Sensibilité (%)	100	97	95	92	67	51
Spécificité (%)	100	100	100	100	100	100

Il n'y a pas de différence significative de sensibilité pour les 3 premières techniques (Eurobio, Cepheid et Argène).

Il n'y a pas de différence significative du Ct moyen obtenu pour chaque kit selon les centres .

Conclusion

Notre PCR temps réel maison a les meilleures performances. Trois kits ont des performances statistiquement identiques à notre test maison (Eurobio, Cepheid et Argène) et deux kits (Diagenode et Bioadvance) ont une sensibilité insuffisante pour être utilisés pour le diagnostic de la coqueluche.