Rapport annuel d'activité

2015

Centre National de Référence de la coqueluche et autres bordetelloses

Année d'exercice

2014

SOMMAIRE

RESUME ANALYTIQUE 4

1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR 5

2 ACTIVITÉS D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2014 6

2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2014 6

2.2 NATURE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES REÇUS AU CNR EN 2014 7

2.3 NOMBRE DE PRELEVEMENTS ET D'ISOLATS CLINIQUES REÇUS EN 2014 7

2. 4 NOMBRE DE PCR REALISEES EN 2014 9

2.5 NOMBRE DE SEROLOGIES REALISEES 10

2.6 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES 10

2.7 DISTRIBUTION DES STANDARDS ET DIVERS PRODUITS BIOLOGIQUES 11

3 ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE 12

3.1 PARTICIPATION A DES RESEAUX DE SURVEILLANCE 12

3.2 SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION DE LA COQUELUCHE 13

3.3 SURVEILLANCE DES BORDETELLOSES AUTRES QUE LA COQUELUCHE 13

3.3.1 Infections humaines à *B. bronchiseptica* *13*

3.3.2 Autres bordetelloses humaines *13*

3.4 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX 14

3.4.1 Antibiotiques *14*

3.4.2 Vaccins *14*

3.5 DETECTION ET INVESTIGATION DE CAS GROUPES ET DE PHENOMENES ANORMAUX 14

3.6 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS 15

3.6.1 Europe *15*

3.6.2 International *15*

3.7 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE 15

4 ALERTE 16

5 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL 16

5.1 NOMBRE D'APPELS ET DE MESSAGES 16

5.2 ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT 17

5.3 EXPERTISE 18

6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR 19

6.1 INTRODUCTION ET RESUME DES TRAVAUX REALISES DE 1989 A 2013 19

6.2 RECHERCHES EFFECTUEES PAR LE CENTRE NATIONAL DE REFERENCE EN 2014 21

6.2.1 Polymorphisme et évolution spatio-temporelle des espèces de Bordetelles *21*

6.2.2 Techniques de diagnostic des bordetelloses par PCR en temps réel (PCR-TR) *24*

6.2.3 Analyse de la durée de l'immunité induite par les vaccins coquelucheux acellulaires *25*

6.3 RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE, EN RELATION AVEC L'ACTIVITE DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE EN 2014 25

6.3.1 Comment évoluent les populations de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis* au cours du temps en France ? *26*

6.3.2 Comment évolue la population de *Bordetella pertussis* au cours du temps dans d'autres pays ayant des stratégies vaccinales différentes ? *29*

6.3.3 Quelle est l'épidémiologie de la coqueluche à Bucarest ? *30*

6.4 COMMUNICATIONS NATIONALES (TOUTES SUR INVITATION) 30

6.5 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES (TOUTES SUR INVITATION) 31

6.6 PUBLICATIONS NATIONALES 31

6.7 PUBLICATIONS INTERNATIONALES 31

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE 33

ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR 34
1.1 MISSIONS 34
1.2 EQUIPE 34
1.3 DEMARCHE QUALITE 35
ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR 39
2.1 IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES BACTERIES DU GENRE BORDETELLA 39
2.2 CONSTITUTION D'UNE COLLECTION 40
2.3 LISTE DES DIAGNOSTICS BIOLOGIQUES UTILISES ET RECOMMANDES PAR LE CNR POUR LA SURVEILLANCE DES BORDETELLOSES 40

RESUME ANALYTIQUE

En 2014,

- Le cycle de coqueluche qui avait commencé en 2012 et continué en 2013 s'est terminé en 2014.
- Comme en 2013, 15 % des isolats de *Bordetella pertussis* n'expriment plus la pertactine, un des composants antigéniques de certains vaccins coquelucheux acellulaires tout comme 100% des isolats de *Bordetella parapertussis*;
- L'estimation de la durée de l'immunité induite par les vaccins coquelucheux acellulaires est d'environ 6 ans après le rappel à 16-18 mois ;
- Les PCR en temps réel pour la détection du matériel génétique de *Bordetella parapertussis*, ainisi que la détection différentielle de *Bordetella parapertussis et B. bronchiseptica* sont utilisées en routine depuis fin 2013 ;
- Le CNR a participé à un contrôle de qualité externe (QCMD) ;
- Le CNR a obtenu l'accréditation selon le référentiel ISO 15189 de 2 techniques de PCR en temps réel pour la détection du matériel génétique de *Bordetella*.

1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Le Centre National de Référence (CNR) de la coqueluche et autres bordetelloses, a poursuivi en 2014 ses différentes missions concernant les infections humaines dues aux bactéries du genre *Bordetella* dans l'unité de recherche « Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines » (PTMMH) de l'Institut Pasteur. Ces missions sont listées en annexe 1, seules sont indiquées ici les plus importantes réalisées en 2014 :

- Poursuite de la surveillance des bordetelloses dues à *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*. Cette surveillance s'avère toujours nécessaire et indispensable car :
    - seuls les vaccins coquelucheux sous-unitaires ou acellulaires (Ca) sont maintenant utilisés, comme dans presque toute l'Europe. Un cycle de coqueluche a été observé en 2012-2013. Nous avons été les premiers à montrer que, pendant ce cycle, une augmentation d'isolats de *B. pertussis* ne produisant pas un antigène vaccinal était observé et que ces isolats pouvaient impacter l'efficacité vaccinale induite par les vaccins acellulaires ; Les isolats circulants de *B. parapertussis* ne produisent plus non plus cet antigène depuis 2007.
    - La stratégie vaccinale a été modifiée en 2013 avec un schéma 2+1 et un rappel à 6 ans à la place d'un schéma 3+1 avec un rappel à 16-18 mois, sans rappel à 6 ans. De plus les valences diphtérie et coquelucheuse des vaccins coquelucheux acellulaires (ca) sont maintenant plus faibles pour les adolescents en comparaison avec l'ancien schéma ;
    - les seuls diagnostics biologiques remboursés, la culture et la "PCR en temps réel" (PCR-TR), sont soit très spécifiques mais peu sensibles chez l'adulte pour la culture, soit très sensibles mais moins spécifiques et surtout très délicats pour la PCR-TR. Pour cette raison, de nouvelles PCR plus spécifiques ont été développées. Parallèlement, nous avons continué à évaluer les trousses de diagnostic qui sont régulièrement mises sur le marché.

2 ACTIVITÉS D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2014

La description des techniques disponibles est présentée en Annexe 1.

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2014

- **Techniques développées ou en développement :**

A) Méthode d'identification avec la technologie MALDI-TOF (BRUCKER)

Nous avons mis en place la méthode d'identification des Bordetelles par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, le spectre obtenu à partir d'une colonie bactérienne, avec ou sans étape d'extraction, a été comparé avec la base de données BRUCKER déjà existante. Le test comparatif a été effectué avec une série d'isolats de notre collection. Nous avons obtenu de meilleurs résultats avec la colonie bactérienne déposée sans étape d'extraction.

Nous avons vérifié si les isolats de *B. pertussis* et de *B. parapertussis* collectés au cours des différentes ères - pré-vaccinale, post-vaccinale-vaccins à germes entiers et post-vaccinale-vaccins acellulaires - étaient identifiés de façon semblable puisque des différences ont été observées (**REF04** et **REF11**). L'identification par comparaison avec la base de données BRUCKER a donné des résultats satisfaisants pour les espèces classiques du genre *Bordetella*.

En perspective nous allons continuer à tester les isolats qui appartiennent à des espèces rencontrées moins fréquemment. Nous utilisons cette technique d'identification en routine depuis plusieurs mois. L'importance de cette technique est un coût moindre en terme de temps et de réactifs.

B) PCR-TR FLA

La PCR, en 2 temps et en temps réel, développée récemment (**REF 03**) qui permet de détecter de façon différentielle *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* est utilisée maintenant en routine au laboratoire. Elle permet de confirmer l'identification spécifique de l'espèce *parapertussis* ou de préciser l'espèce de *Bordetella* lors d'infection coquelucheuse pour laquelle la recherche de *B. pertussis*, et de *B. holmesii* est négative.

- **Techniques transférées vers d'autres laboratoires :**

Les techniques de diagnostic biologique de la coqueluche par PCR-TR recommandées suite aux réunions de consensus européen (ECDC) sont transmises aux laboratoires demandeurs qu'ils soient hospitaliers ou de biologie médicale ou du réseau international des IP.

2.2 Nature des échantillons biologiques reçus au CNR en 2014

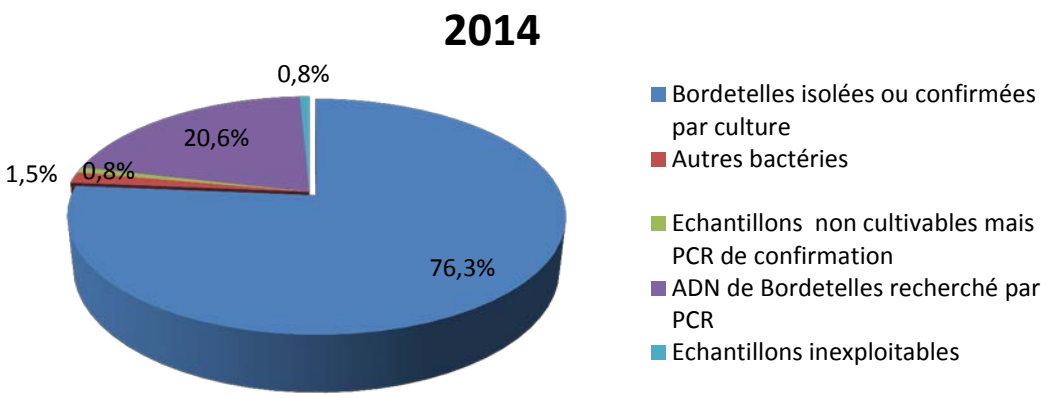
L'ensemble des échantillons biologiques reçus au laboratoire est géré informatiquement à l'aide du logiciel Lagon. Les prélèvements biologiques (aspiration ou écouvillon naso-pharyngé, expectoration, sérum, ADN extrait de prélèvement respiratoire) que nous avons reçus en 2014 provenaient essentiellement de :

- patients infectés par *B. pertussis* soit hospitalisés soit lors d'infection communautaire et dont les prélèvements sont envoyés par les cliniciens participant au réseau RENACOQ;
- patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (crèches, établissements scolaires, collectivités..);
- 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;
- l'unité de recherche a reçu des prélèvements dans le cadre de la surveillance ACTIV

2.3 Nombre de prélèvements et d'isolats cliniques reçus en 2014

Nous avons reçu en 2014 : 100 isolats cliniques du genre *Bordetella*, 1 isolat d'un autre genre bactérien, 1 isolat non cultivable mais qui a pu être identifié comme *Bordetella pertussis* par PCR, 16 prélèvements ou ADN extrait sur lesquels une PCR a été réalisée (12 PCR positives) et un prélèvement inexploitable (**Figure 1**).

Figure 1 : Répartition des échantillons (isolat ou prélèvement) reçus au CNR en 2014



Dans le cadre du réseau RENACOQ :

- 69 isolats de *B. pertussis* dont 2 isolats collectés chez le même patient et 2 isolats collectés le même jour chez 2 enfants de la même famille ;
- 9 isolats de *B. parapertussis*

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

- 5 isolats de *B. pertussis* en provenance d'Annecy (x5) ;
- 14 isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine en provenance de Rouen (x1), de Necker-Paris (x4, collectés chez le même patient), de Suresnes (x2), de Granville (x2), de Nantes (x1), de la Roche sur Yon (x1) et d'Epinal (x1) ;
- 1 isolat de *B. holmesii* en provenance de Saint Brieuc ;
- 2 isolats de *B. hinzii* en provenance de Tourcoing (x1) et de Bordeaux (x1) ;
- 1 isolat de *B. trematum* en provenance de Nantes

Le nombre d'isolats cliniques de *B. pertussis*, reçu en 2014 au CNR est revenu à un niveau correspondant à une fin de cycle puisque situé entre 2010 et 2011 (Figure 2 et Tableau 1)

Figure 2 : Répartition par espèce de Bordetelles reçues ou isolées au CNR en 2014

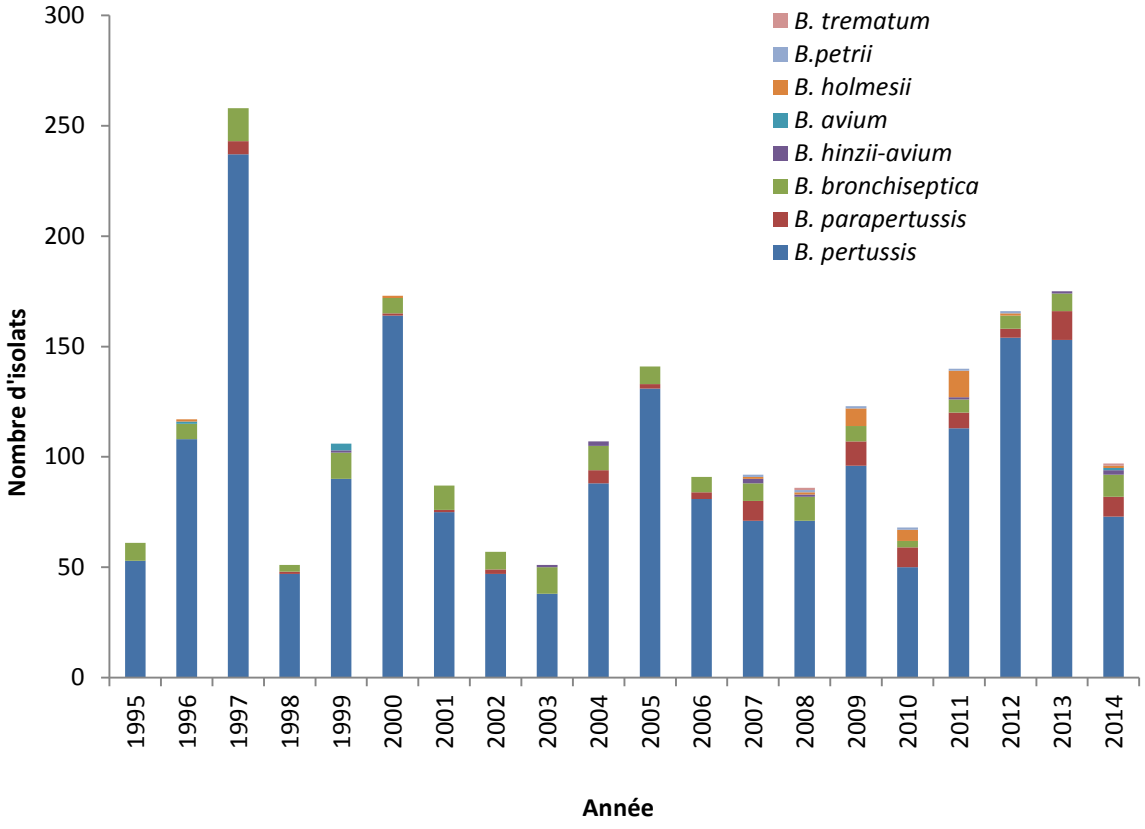


Tableau 1 : Répartition par année des principales espèces responsables de bordetelloses humaines

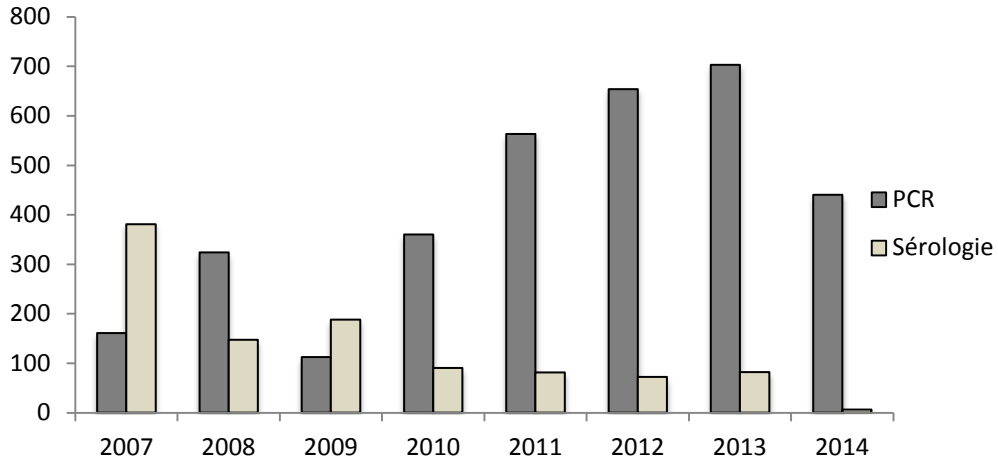
ESPECES \ ANNEES	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
B. pertussis	108	237	47	90	164	75	47	38	88	129	81	71	71	96	50	113	154	155	72
B. parapertussis	0	6	1	0	1	1	2	0	6	2	4	9	0	11	9	7	4	16	9
B. bronchiseptica	7	15	3	12	7	11	8	7	11	8	3	8	11	7	3	6	6	10	10
B. holmesii	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	8	5	12	1	0	1

2. 4 Nombre de PCR réalisées en 2014

Nous avons réalisé 440 PCR en temps réel (Figure 3) :

- 108 dans le cadre de la surveillance RENACOQ
- 28 dans le cadre de la demande de l'ARS/CIRE de Lyon pour des cas groupés de coqueluche dans une école
- 109 dans le cadre du test de 2 trousses commerciales multiplexées
- 195 dans le cadre du contrôle de qualité externe (QCMD)

Figure 3 : Diagnostics biologiques, enquêtes collaboratives et CQ réalisés par le CNR pour les années 2007 à 2014



2.5 Nombre de sérologies réalisées

En 2014, nous avons réalisé 6 sérologies dans le cadre de la surveillance des bordetelloses.

La figure 3 montre la comparaison du nombre de PCR et sérologies réalisées de 2007 à 2014. Le nombre de sérologies demandées au CNR a très nettement diminué en 2014 par rapport aux années précédentes… il aura fallu 5 ans pour que les recommandations soient suivies ! De même, le nombre de PCR a diminué en 2014, reflétant la fin du cycle de coqueluche de 2012-2013.

2.6 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

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

2.7 Distribution des standards et divers produits biologiques

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

3 ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE

3.1 Participation à des réseaux de surveillance

Nous poursuivons la collaboration avec :

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

Figure 4 : Répartition des hôpitaux du réseau RENACOQ

3.2 Surveillance de l'évolution de la coqueluche

En 2014, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et à *B. parapertussis.* L'analyse des données obtenues pour 2014 par l'InVS n'est pas encore terminée. Le nombre d'isolats reçus au CNR par le réseau (**Figure 2** et **Tableau 1**) en 2014 est inférieur à celui des isolats reçus en 2013, confirmant la fin du cycle de coqueluche de 2012-2013. Nous devrions observer une diminution du nombre de cas en 2015. Depuis 1991, des cycles de coqueluche ont été observés, comme indiqué dans la figure 2, en 1994, 1997, 2000, c'est-à-dire tous les trois ans, et en 2005. Puis 7 ans après. **L'augmentation de l'intervalle est-il dû à l'augmentation de la couverture vaccinale ? Pour répondre à cette question, Il est important que l'action du réseau RENACOQ se poursuive, afin d'évaluer précisément cet impact dans les dix prochaines années, ceci avec des diagnostics spécifiques !**

En 2014, l'âge des patients (n=73) sur lesquels ont été collectés les isolats est comparable à celui des années 2012 et 2013 avec 55 % des isolats collectés chez des nouveau-nés de moins de 6 mois et 11 % chez des plus de 16 ans.

Les infections à *B. parapertussis* sont toujours rares mais il faut signaler une légère augmentation de ces infections depuis 2007 (Figure 2, Tableau 1).

3.3 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

3.3.1 Infections humaines à *B. bronchiseptica*

La surveillance de ces infections s'est poursuivie. Il s'agit de cas d'infections à *B. bronchiseptica* d'une part, chez un nourrisson prématuré de 2 mois ayant une toux intermittente et d'autre part, chez un enfant de 10 ans atteint de mucoviscidose (Publication soumise à EID).
Les autres cas d'infections concernent des adultes immunodéprimés, la plupart âgés de plus de 50 ans (22, 32, 60, 65, 66, 74, 80 et 83 ans), dont la majorité sont atteints de symptômes respiratoires. Un des patients infecté vit avec 2 chiens. La recherche de portage sur les chiens s'est avérée négative.

3.3.2 Autres bordetelloses humaines

Nous avons reçu en 2014 :

- 1 isolat de *B. holmesii* envoyé par l'hôpital de Saint Brieuc. Il a été isolé d'une hémoculture chez une patiente, âgée de 90 ans, ayant un syndrome inflammatoire et de

la fièvre.

- 2 isolats de *B. hinzii* envoyés :
    - par l'hôpital de Tourcoing. Il a été collecté chez un patient, âgé de 55 ans, ayant une infection du liquide d'ascite avec bactériémie associée
    - par l'hôpital de Bordeaux. Il a été collecté chez un patient, âgé de 75 ans, ayant une détresse respiratoire en post-opératoire d'une laryngectomie partielle sur pneumopathie à SARM. Voir chapitre 6.2.1
- 1 isolat de *B. trematum* envoyé par l'hôpital de Nantes. Le patient, âgé de 76 ans, avait subi une néphrectomie partielle en 2013. Il a été hospitalisé de nouveau en pneumologie en 2014, avec mise en évidence de *B. trematum* sur collection post- néphrectomie.

3.4 Surveillance de la résistance aux anti-infectieux

3.4.1 Antibiotiques

Aucun isolat de *B. pertussis* ou *B.parapertussis*, résistant aux macrolides, a été identifié en 2014. Cependant, la surveillance doit continuer car d'une part, deux publications récentes ont indiqué la prévalence très élevée des isolats de *B. pertussis* résistants aux macrolides en Chine et d'autre part, un premier cas de résistance aux macrolides a été décrit en Iran.

3.4.2 Vaccins

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

3.5 Détection et investigation de cas groupes et de phénomènes anormaux

En 2014, nous avons apporté une aide au diagnostic lors de cas groupés d'infections respiratoires par téléphone et par courriel (**Figure 5**)

3.6 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

3.6.1 Europe

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

3.6.2 International

L'unité de recherche qui héberge le CNR, a continué sa mission de formation au sein des Instituts Pasteur du Réseau International afin de maintenir un réseau de maladies à prévention vaccinale (réseau SURVAC). En 2014 l'unité de recherche a poursuivi sa collaboration avec Tunis, Alger, Téhéran et Saint-Pétersbourg et a établi des collaborations avec Casablanca, et Bucarest.

3.7 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Nous continuons à avoir les données des laboratoires CERBA concernant l'évolution de l'utilisation des diagnostics biologiques en France. Le nombre de PCR réalisées par le laboratoire Cerba en 2014 est de 16752 et a augmenté de 1,17. A l'inverse, les demandes de sérologies sont de 12791 et ont diminué d'un facteur 2. Ces données indiquent que les recommandations du CSHPF de 2008 concernant le diagnostic biologique commencent à être suivies et corrèlent avec le fait que le diagnostic par PCR-TR est maintenant remboursé. Nous espérons que la baisse des sérologies se poursuivra encore plus rapidement avec les nouvelles recommandations de 2014 (hcspr20140710_conduitenircascoqueluche.pdf).

Tableau 2 : Nombre de PCR et sérologies réalisées au départ par le CBMS de l'Institut Pasteur puis par le laboratoire Cerba entre 2000 et 2014

ANNEES / DIAGNOSTICS	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PCR	2595	1616	1609	1176	1603	2500	2184	2271	2306	2588	2133	7611	13115	14341	16752
Sérologie	13628	14165	13181	14293	17492	46606	49500	68803	77537	65318	42779	32742	25306	23572	12791

Sur les 16752 PCR, 8,6% étaient positives pour le genre *Bordetella*, ce qui indique une diminution par rapport à 2013 (15,3% étaient positives) et corrélant avec les résultats du CNR.

4 ALERTE

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

5 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

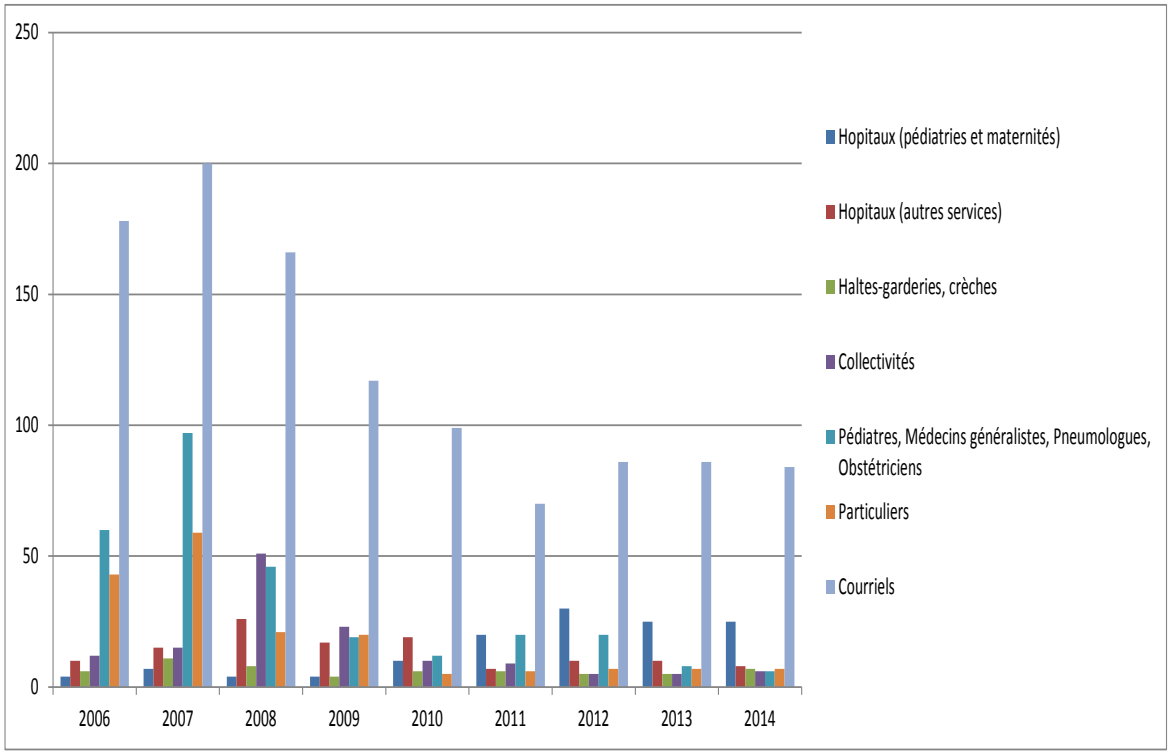
Nous avons poursuivi nos missions d'enseignements, de formation et d'accueil de stagiaires.

Les informations concernant le CNR sont sur notre site web (http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses) et sont régulièrement mises à jour.

5.1 Nombre d'appels et de messages

En 2014, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel. La comparaison avec les années précédentes est indiquée dans la figure 5.

Figure 5 : Sollicitations téléphoniques ou par courriels du CNR Coqueluche our les années 2006 à 2014



5.2 Activités d'enseignement

Nicole Guiso

Dans le cadre de l'Institut Pasteur, Cours sur la Circulation des Agents Infectieux et Maitrise des Risques : « **Evolution de l'épidémiologie des maladies infectieuses en fonction de la vaccination : exemples avec la coqueluche et la diphtérie »** – le 11 février 2014 (2h30)

Dans le cadre du cours AgroParisTech 2014 : «**Vaccination coquelucheuse et épidémiologie de la maladie**» Paris -- le 5 mars 2014 (1h30)

Dans le cadre du Cours International Francophone de Vaccinologie, 2014: « **La vaccination coquelucheuse : conséquences de soixante années de vaccination** » Paris -- le 12 mars 2014 (2h00)

Dans le cadre du cours anglophone de Vaccinology : "**Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the examples of Diphtheria and Whooping cough"** Paris – le 26 mars 2014 (1h30)

Dans le cadre de l'Institut Pasteur, Cours de bactériologie Médicale : « **Le Genre Bordetella : évolution depuis l'introduction de la vaccination coquelucheuse** » - le 25 Septembre 2014

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-Sud à la faculté de Chatenay Malabry : "***B. pertussis* et les vaccins coquelucheux**" - le 21 octobre 2014 (3 heures).

5.3 Expertise

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

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

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

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

6.1 Introduction et résumé des travaux réalisés de 1989 à 2013

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

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

Les recherches de notre unité ont consisté :

- à standardiser le modèle murin d'infection respiratoire par voie intranasale,
- à déterminer le rôle des différentes toxines et adhésines au cours de l'infection à l'aide de ce modèle ;
- à caractériser le rôle de l'AC-Hly en tant que toxine ;
- à montrer qu'elle agit en synergie avec la PT dans le cas d'une infection par *B. pertussis* ;
- à caractériser les réponses après infection et après vaccination chez la souris mais aussi chez l'homme. Nous avons pu, en particulier, montrer que la vaccination par des vaccins sous-unitaires (Ca) 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 à germes entiers (Ce).

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

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

Parallèlement à cette recherche, nous avons participé à partir de 1990 à un certain nombre d'enquêtes avec des pédiatres hospitaliers et des médecins généralistes. Elles ont permis de montrer le changement d'épidémiologie en France depuis l'introduction de la vaccination généralisée en 1966 avec des vaccins combinés (D-T-Polio-Coq-Hib). Ces différentes enquêtes ont montré que les adolescents et les adultes, dont l'immunité a diminué au cours du temps constituent un réservoir pour les jeunes nourrissons trop jeunes pour être vaccinés. Ces observations ont amené le Comité Technique des Vaccinations Français à introduire un rappel vaccinal pour les adolescents à 11-13 ans en 1998, pour les jeunes adultes et le personnel

hospitalier en contact avec les nourrissons en 2004, pour tous les personnels de profession médicale, y compris ceux travaillant dans les collectivités de personnes âgées et pour tous les adultes n'ayant pas eu de rappel vaccinal depuis dix ans à l'occasion d'un rappel décennal ou lors d'un projet parental pour les futurs parents mais aussi pour tous les adultes qui seront dans l'entourage du bébé et en 2008 pour tous les adultes à l'occasion du rappel à 27-28 ans et pour tout le personnel hospitalier. De plus des recommandations ont été rédigées pour la conduite à tenir lors de cas de coqueluche groupés.

6.2 Recherches effectuées par le Centre National de Référence en 2014

6.2.1 Polymorphisme et évolution spatio-temporelle des espèces de Bordetelles

Espèces *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*

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

La majorité des isolats, collectés en 2014, ont les caractéristiques bactériologiques habituelles. Ils expriment tous une protéine fimbriale : en majorité la protéine fimbriale 3 (83% en 2014 ; 93 % en 2013). On observe une augmentation des isolats qui expriment la protéine fimbriale 2 (17% en 2014 ; 6 % en 2013). Tous les isolats expriment l'AC-Hly. Leur typage par la technique d'électrophorèse en champs pulsés (ECP) montre qu'ils appartiennent tous au groupe ECP IV (**Figure 6**). La répartition en sous-groupe (ECP) ne montre pas de changement depuis 2008.

La majorité des isolats collectés et testés expriment les toxines et adhésines. L'allèle du promoteur du locus codant la PT est de type 3, de la sous-unité A de la PT est de type *ptx*A1 et celui de la PRN est de type *prn*2, comme la plupart des isolats circulant depuis 1990. Cependant, il est important de noter que depuis 2005 des isolats n'exprimant pas un des antigènes vaccinaux, la PRN, circulent. La proportion de ces isolats a augmenté d'année en année et a atteint 14 % en 2012. Cette proportion est stationnaire en 2014, comme en 2013.

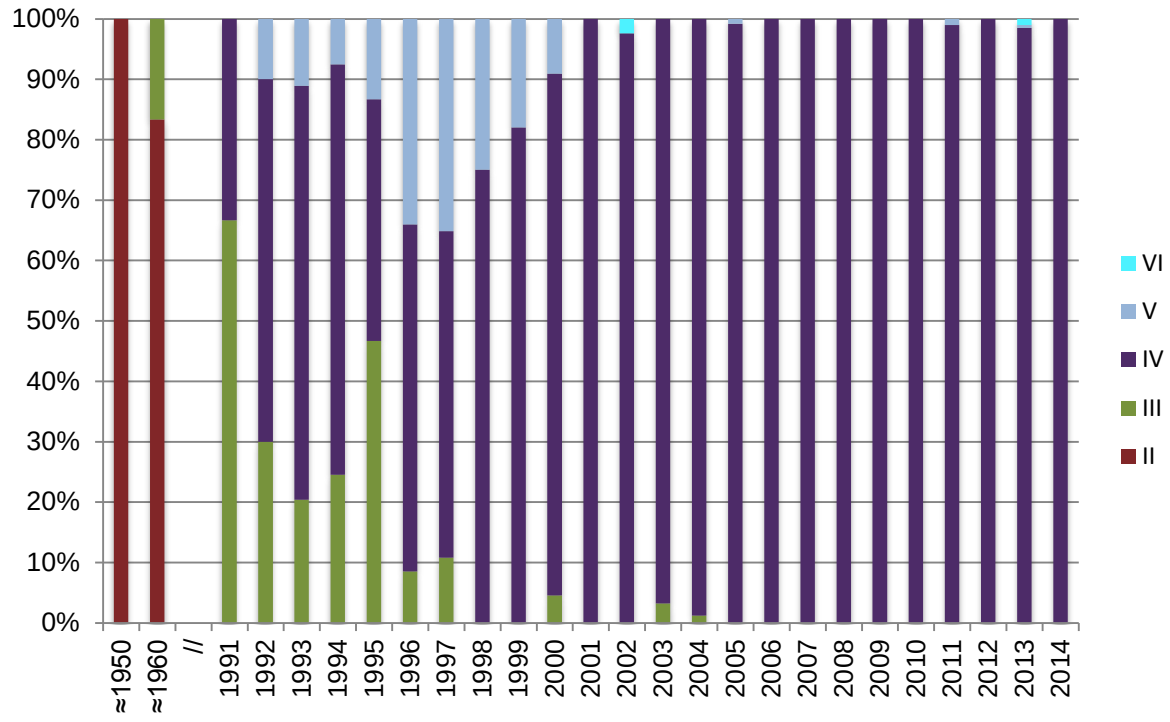
Par ailleurs, 98 % des isolats de *B. parapertussis* n'expriment plus la PRN depuis 2007. De plus, un nouveau groupe ECP a été mis en évidence en 2005. Ce groupe ECP, appelé BPPII, comprend 76 % des isolats récemment collectés.

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

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

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

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



Espèce *Bordetella hinzii*

Bordetella hinzii est une espèce du genre *Bordetella* qui est impliquée dans les infections respiratoires chez les volailles. Quelques cas d'infection pulmonaire ou digestive et de bactériémies ont été décrits chez l'homme. Au cours des deux dernières années, notre CNR a reçu 2 isolats collectés chez des patients ayant une infection pulmonaire à *B. hinzii*.

1er cas : En avril 2013, un patient âgé de 43 ans avait été admis à l'hôpital de Rennes avec de la

fièvre, de la fatigue et une exacerbation bronchique. Ce patient, ayant été diagnostiqué pour une leucémie aigue myéloïde 15 mois plus tôt (jan 2012), avait alors arrêté son activité professionnelle de nettoyage par haute pression des canalisations et cuves de déchets des chaines d'abattage de volailles. Il était en rémission lorsqu'il a été de nouveau hospitalisé en 2013. L'analyse bactériologique du crachat effectué lors de son admission avait mis en évidence une concentration importante (10^9 CFU/ml) de *B. hinzii*. L'isolat avait été envoyé au CNR pour confirmation de l'identification. L'analyse de l'ADN codant l'ARN 16S avait permis de confirmer l'identification de *B. hinzii.*

Il s'agit du premier cas où une exposition aviaire est mise en évidence avec une persistance présumée de *B. hinzii* chez le patient pendant plus de un an (**Poster présenté à la RICAI 2014**)

2ème cas : Un patient âgé de 74 ans a été hospitalisé en septembre 2014 dans une clinique de Bordeaux pour une laryngectomie partielle et trachéotomie dues à une seconde récurrence d'un cancer du larynx puis il a été transféré dans le service d'urgence de l'hôpital de Bordeaux pour une décompression obstructive pulmonaire 11 jours plus tard. Lors de son admission, il présentait de la fièvre, et une détresse respiratoire ainsi que des sécrétions purulentes au niveau trachéal. L'analyse microbiologique d'une aspiration trachéale a mis en évidence la présence de *B. hinzii* (10^6 CFU/ml). L'antibiothérapie a permis une amélioration de l'état respiratoire du patient qui a pu quitter le service d'urgence pour retourner à la clinique. La survie dans le tube digestif est une autre spécificité de *B. hinzii*. Cela est démontré avec ce patient avec une culture positive à partir d'un prélèvement rectal qui pourrait être la conséquence d'une transmission par voie orale, par exemple par l'ingestion de produits de volaille contaminés comme déjà décrit ou par la déglutition des sécrétions respiratoires.

L'identification en routine de cette espèce de *Bordetella* n'était pas aisée à cause du manque d'outils discriminants. Le développement du MALDI-TOF permet maintenant d'identifier l'espèce *B. hinzii* avec un bon score d'identification comme observé après l'analyse rétrospective de la collection des isolats de *B. hinzii* du CNR effectuée en 2014.

La description de ces deux cas avec une revue de la littérature vient d'être soumise pour publication.

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

Evaluation des trousses commerciales multiplexées (4 cibles)

A) Trousse RIDA® GENE Bordetella

Le coffret RIDA® GENE Bordetella commercialisé par R-Biopharm permet la détection multiplexée en temps réel de l'ADN de *Bordetella*. Alors que la plupart des trousses commercialisées récemment utilisent les cibles l'IS*481* et IS*1001* ainsi qu'une cible cellulaire (ICD), ce coffret contient également la cible h-IS*1001* qui permet d'identifier spécifiquement l'ADN de *B. holmesii,* soit un total de 4 cibles (IS*481*, IS*1001*, h-IS*1001* et ICD). L'utilisation de trousse multiplexée nécessite la mise en place d'un fichier de compensation de couleur qui permet d'éliminer les fluorescences croisées. L'aspect des courbes est correct pour les cibles ICD, h-IS*1001* et IS*1001*. Par contre, l'aspect de la courbe obtenue avec la cible IS*481* rend difficile l'interprétation lorsque la valeur de Ct est élevée (> 35).

Performances de la trousse :

Analyse de différents échantillons d'ADN extraits de prélèvements respiratoires humains avec la trousse Roche « High Pure PCR Template préparation » par comparaison avec les résultats obtenus avec notre technique de référence. Les échantillons testés ont été correctement identifiés.

Analyse d'échantillons du QCMD2013 (contrôle qualité externe) : nous avons testé plusieurs tubes du QCMD2013 et comparé les résultats obtenus avec ceux du QCMD2013. Les résultats sont corrects et les valeurs de Ct sont proches (+/- 2 Ct) de la valeur moyenne de Ct obtenue par le CNR.

Contrôle positif de la trousse : Il contient le même nombre de génome de chacune des trois espèces (*Bordetella pertussis, parapertussis et holmesii*). Sachant que le nombre de copies quelle que soit la séquence d'insertion est différent pour ces trois espèces, on s'attendait à ce que la valeur de Ct varie selon la cible sauf si l'optimisation opératoire avait permis de lisser ces différences. Les résultats obtenus avec nos contrôles positifs ne nous orientent pas vers ce lissage. En conclusion, les résultats obtenus avec les témoins positifs (CQI) varient en fonction de la cible.

Critère de validation des tests : Il n'y a pas vraiment de critère de validation explicité dans le document technique. Concernant l'ICD : le signal d'amplification peut être positif ou négatif selon la quantité d'ADN présent dans l'échantillon. Il n'y a pas de valeur limite de signalisation lorsque le signal est positif. Il serait utile lorsque le contrôle interne sert de témoin d'extraction. En effet, sachant que le volume d'ICD ajouté au moment de l'étape d'extraction des acides nucléiques de l'échantillon est le même pour chaque échantillon, on s'attend à trouver une valeur de Ct limite recommandée reflétant une extraction faite correctement pour l'eau extraite, d'une part, et pour les échantillons, d'autre part.

.

Lors de l'envoi du rapport final au fabriquant, nous lui avons également signalé qu'il manquait des informations dans la notice technique livrée avec le coffret. En particulier dans le chapitre « Limitations of the method » du document technique, il n'est pas indiqué que la cible IS*481* peut être aussi détectée occasionnellement dans le génome de *Bordetella bronchiseptica*.

B) Trousse FASTRACK

Le coffret FASTRACK commercialisé par une société luxembourgeoise permet la détection multiplexée en temps réel de l'ADN de *Bordetella*. Contrairement à la trousse RIDA@GENE, en plus des cibles IS*481* et IS*1001*, le fabricant a choisi d'ajouter la cible IS*1002* qui est présente dans le génome de plusieurs espèces de *Bordetella*. Ce qui complexifie le tableau d'interprétation. La PCR-TR cible donc la séquence de l'IS*481*, de l'IS*1001*, de l'IS1002 et d'un gène humain qui sert de contrôle d'extraction cellulaire (IC).

Un fichier de compensation de couleur a été mis en place comme lors du test de la trousse RIDA@GENE. Les premiers résultats obtenus à partir de différents échantillons d'ADN extraits de prélèvements respiratoires humains avec la trousse Roche « High Pure PCR Template préparation » sont plus ou moins satisfaisants, selon la cible détectée. En particulier, les résultats obtenus indiquent une cross réaction entre le contrôle interne d'extraction (IC) et la cible IS*1002*, au détriment de la cible IS*1002*. Un autre test avec une trousse d'extraction différente (QIAamp de Qiagen, recommandé par le fabricant) a montré le même défaut. Le coffret ainsi que le document technique pour le volet « interprétation des résultats » doivent absolument être améliorés.

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

Cette étude, coordonnée par l'InVS est réalisée par le réseau Sentinelle et le CNR. Elle consiste à confirmer ou à infirmer que les enfants nés en 2001-2012 et atteints de symptômes coqueluchoides ont une infection causée par *B. pertussis* ou *B. parapertussis* ceci à l'aide de nos PCR-TR spécifiques.

6.3 Recherches effectuées par l'unité de recherche, en relation avec l'activité du Centre National de Référence en 2014

En 2014, les principales questions auxquelles nous avons essayé de répondre sont les suivantes :

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

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

Caractéristiques de la population de *Bordetella pertussis*

La réponse à la question posée peut être obtenue en comparant les isolats de l'ère pré-vaccinale à ceux de l'ère post-vaccinale pendant laquelle était utilisé un vaccin Ce et ceux de l'ère post-vaccinale actuelle depuis que nous utilisons des vaccins Ca. Nous avons pu montrer lors des années précédentes une évolution de la population de *B. pertussis* en France à l'aide de la technique ECP mais aussi à l'aide de plusieurs techniques de génomique telles que l'hybridation soustractive, les puces à ADN et le séquençage des génomes. Il a pu être mis en évidence une influence certaine de l'immunité de la population sur la population bactérienne. En effet, la vaccination avec le vaccin Ce a permis le contrôle des isolats semblables aux souches vaccinales. Malheureusement, des isolats circulaient toujours et ils étaient aussi virulents que ceux de l'ère pré-vaccinale. De plus, nous avions pu montrer que le génome des isolats circulant avait diminué. **Ces différentes études nous avaient permis de formuler une hypothèse sur l'évolution des isolats circulant dans des régions utilisant des vaccins Ca et où la couverture vaccinale est de plus en plus élevée.** Ces vaccins ciblent la virulence des isolats et non l'ensemble de la bactérie. Comme tous les isolats qui continuent à circuler sont virulents et que la couverture vaccinale augmente avec les rappels adolescents et adultes, une diminution de la circulation des isolats virulents devrait être observée. La présence d'un grand nombre de copies de séquences d'insertion sur le chromosome des isolats actuels pourrait faciliter la délétion des gènes de virulence. Il s'avère que nous n'avons pas pu mettre en évidence de nouvelles différences au niveau du génome par ECP mais certaines ont été observées au niveau de la production des protéines bactériennes et en particulier, les antigènes vaccinaux. Pour cette raison nous avons poursuivi nos analyses au niveau génomique mais aussi au niveau transcriptomique et protéomique (V. Bouchez et al, en préparation).

Au niveau génomique

Huit isolats collectés soit durant l'ère pré-vaccinale (2) soit l'ère vaccin post-Ce (1) soit l'ère post-Ca (5) indiquent une augmentation temporelle des « single nucleotide polymorphism ou SNP » ; 25% étant synonymes c'est-à-dire silencieux au niveau de la séquence protéique mais 40% non synonymes et donc pouvant impacter directement le protéome de la bactérie. Un point important est que les gènes codant l'AC-Hly, la FHA et les protéines impliquées dans la biosynthèse du LPS ne possèdent pas de SNP suggérant une stabilité de ces protéines et donc leur importance pour la bactérie. Mais ce qu'i faut aussi signaler c'est que les isolats collectés lors du dernier cycle de coqueluche se différencient bien des autres isolats (**REF 04**).

Au niveau transcriptomique

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

Au niveau de la production des déterminants de virulence :

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

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

Les isolats ne produisant pas PRN, ont une pathogénicité semblable aux isolats produisant la PRN dans le modèle murin. La cause génétique de la non-production de la PRN est due, soit à la délétion du gène, soit à la délétion de plusieurs nucléotides, soit à des mutations soit à des additions ou délétions de nucléotides soit, et principalement, à l'intégration d'une IS dans le gène**. Ceci est un résultat important car cela signifie qu'il ne s'agit pas d'un clone émergent mais qu'il s'agit bien de la fluidité du chromosome de *B. pertussis*. Seule la proportion des isolats ne produisant pas de la PRN a augmenté depuis 2007. Cette proportion est stationnaire depuis 2012 et atteint 15% des isolats collectés en 2013 et 2014. Il va être**

important de poursuivre cette surveillance car nous avons montré que ces isolats pourraient avoir un rôle sur une modification de la durée de protection induite par les Ca.
En ce qui concerne l'analyse temporelle du LPS produit par les souches vaccinales et les isolats cliniques, aucune différence n'a pu être mise en évidence **confirmant ainsi les données de génomique.**

Au niveau de la cytotoxicité dans un modèle cellulaire

Nous avions précédemment montré que l'AC-Hly était la toxine responsable de l'apoptose des macrophages alvéolaires *in vitro* et *in vivo*. Tous les isolats de *B. pertussis* exprimant et produisant l'AC-Hly sont cytotoxiques. Nous avons pu montrer que cette cytotoxicité était inhibée par des anti-AC-Hly spécifiques comme attendu mais aussi par des anti-PRN, suggérant une interaction entre l'AC-Hly et la PRN. Comme attendu la cytotoxicité des isolats ne produisant pas de PRN n'est pas inhibée par des anticorps anti-PRN. Nous avons pu observer aussi que ni les anti-PT ni les anti-FHA n'inhibaient cette cytotoxicité. Cela était attendu pour les anti-PT mais pas pour les anti-FHA car une interaction entre AC-Hly et FHA avait été montrée précédemment. Cependant, la cytotoxicité des isolats collectés lors du cycle de coqueluche de 2012-2013 est, elle, inhibée par les anti-FHA, que les isolats produisent ou non la PRN. Ceci est un deuxième argument après celui du séquençage du génome de ces isolats pour dire qu'ils ont différents de ceux qui circulaient auparavant.

Au niveau de la pathogénicité dans le modèle murin d'infection respiratoire

Les isolats de l'ère pré- ou post-Ce ou post-Ca ont une virulence semblable dans le modèle murin d'infection respiratoire. Ces résultats corrèlent avec ceux que nous avons obtenus *in vivo* sur les nourrissons. En effet, nous avions montré que les symptômes cliniques (toux nocturne, toux paroxystique, chant du coq, fièvre, perte de poids, apnée, cyanose, vomissements, bradycardie, toux paroxystique, hyperlymphocytose, coqueluche maligne) de nourrissons infectés par des isolats produisant ou ne produisant pas la PRN des nouveau-nés ne présentent pas de différence significative. La seule différence significative est l'intervalle de temps entre le début de la toux et l'hospitalisation suggérant une plus faible virulence des isolats PRN. Mais il est important de noter que la vaccination était associée avec des symptômes moins sévères dans les deux groupes.

Au niveau de la protection conférée par les vaccins acellulaires (Ca), nous avons comparé la capacité d'un vaccin Ca à induire une immunité protectrice vis à vis d'une infection due à différents isolats de Bp produisant ou non de la PRN. Il s'avère que les isolats ne produisant plus

la PRN échappent plus facilement à l'immunité vaccinale. Ceci a été ensuite confirmé dans l'Ouest des Etats Unis lors du cycle de coqueluche en 2014.

Caractéristiques de la population de *B. parapertussis*

Au niveau de la bactérie

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

Au niveau de l'expression des facteurs de virulence

98 % de ces isolats circulant depuis 2007 n'expriment pas la PRN ! Cela est dû soit à un A dans la région répétée I de la PRN, soit à un G dans la région répétée II du gène soit à une délétion de plusieurs nucléotides. Là encore il ne s'agit donc pas d'un seul clone.

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

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

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

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

Par ailleurs, nous avons poursuivi nos travaux dans le cadre du réseau EUpertstrain avec

nos collègues européens. **Ces travaux montrent qu'au niveau génomique les isolats circulant en Europe sont très semblables mais qu'ils sont différents de ceux circulant il y a 10 ans.**

Nous avons aussi initié une collaboration avec nos collègues australiens. Il s'avère que des isolats qui n'expriment pas la PRN circulent aussi dans ce pays qui utilise un vaccin Ca depuis une dizaine d'années **(REF 03)**.

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

L'incidence de la coqueluche en Roumanie est largement sous-estimée comme dans beaucoup de pays dans le monde par manque de surveillance active. En 2012, une étude a été réalisée sur un an à Bucarest et la région alentour afin d'analyser la circulation de *B. pertussis*. (REF 02). Cinquante et un sujets suspects de coqueluche ont été enrôlés. La culture, la PCR-TR et la recherche d'anticorps anti-toxine de pertussis avec la technique de référence ont été utilisés comme diagnostic biologique. La coqueluche a été confirmée chez des patients de tous âges (63%), la plupart non ou incomplètement vaccinés. Le matériel génétique de *B. holmesii* a été détecté chez 22% des patients ! Ces patients étaient des adolescents et adultes comme en France et aux Etats-Unis mais à notre grande surprise aussi chez des jeunes enfants !

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

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

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

6.4 Communications nationales (toutes sur invitation)

1. **GUISO N.** : Congrès des Sociétés de Pédiatrie « *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis* : Facteurs de virulence et diagnostics biologiques » Lyon, 23 mai 2014

2. **GUILLOT S.** Congrès RICAI « Evolution des populations de *Bordetella pertussis* et *parapertussis* sous pression vaccinale *?* », 28 novembre 2014

6.5 Communications internationales (toutes sur invitation)

1. **GUISO N**. Conférence **«** Why is *Bordetella pertussis* still circulating ?». Lisbonne-Portugal 30-01 au 03-02-2014

2. **GUISO N**. Congrès – « Current pertussis epidemiology and strategies for prevention and surveillance » Moscou, Russie, 14 au 16-02-2014

6.6 Publications nationales

1. **GUISO N.** La coqueluche du nourrisson de l'enfant et de l'adulte**. EMC-Maladies Infectieuses** (2014)

2. **GUISO N.** Facteurs de virulence de *Bordetella pertussis et Bordetella parapertussis* et diagnostics biologiques de la coqueluche**. Archives de Pédiatrie** (2014)

6.7 Publications internationales

1. **GUISO N.** *Bordetella pertussis*: Why is it still circulating? **J. of Infection** (2014) - S119–S124.Vol. 68

2. DINU S, **GUILLOT S**, DRAGOMIRESCU CS, **BRUN D**., LAZAR S, VANCEA G, IONESCU G, GHERMAN MF, BJERKESTRAND AF, UNGUREANU V, **GUISO N** AND DAMIAN M. Whooping cough in South-East of 1 Romania-a one year study. **Diag. Microbiol. and Infect. Dis.** (2014) 78(3):302-6

3. TIZOLOVA A, **BRUN D, GUISO N et GUILLOT S**. Development of Real-Time PCR assay for differential detection of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. **Diag. Microbiol. and Infect. Dis.** (2014), 78(4):347-51

4. LAM C, OCTAVIA S, RICAFORT, SINTCHENKO V, GILBERT GL, WOOD N, MCINTYRE P, MARSHALL H, **GUISO N**, KEIL AD, LAWRENCE A, ROBSON J, HOGG G, and LAN R. Rapid increase in Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Australia. **Emerging infect. Dis.** (2014), 20(4), 626-633

5. **HEGERLE N** et **GUISO N.** Changes in the circulating *Bordetella pertussis* population modifies antibody inhibition of macrophage apoptosis**. Microbiology** (2014).

6. BARKOFF MG, **GUISO N**, **GUILLOT S**, XING D, MARKEY K, BERBERS G, MERTSOLA J, HE Q. A rapid ELISA-based method for screening Bordetella pertussis strain production of antigens included in current acellular pertussis vaccines. **J. Immunol. Methods** (2014) 408:142-148

7. BART MJ, HARRIS SR, ADVANI A, ARAKAWA Y, BOTTERO D, **BOUCHEZ V**, CASSIDAY PK, CHIANG CS, DALBY T, FRY NK, GAILLARD ME, Van GENT M, **GUISO N**, HALLANDER HO, HARVILL ET, He Q, Van Der HEIDE HG, HEUVELMAN K, HOZBOR DF, KAMACHI K, KARATAEV GI, LAN R, LUTYNSKA A, MAHARJAN P, MERTSOLA J, MIYAMURA T, OCTAVIA S, PRESTON A, QUAIL MA, SINTCHENKO V, STEFANELLI P, TONDELLA ML, TSANG RS, XU Y, YAO SM, ZHANG S, PARKHILL J, MOOI FR. Global Population Structure and Evolution of *Bordetella pertussis* and Their Relationship with vaccination. **MBio**. (2014) 22;5(2):e01074

8. **HEGERLE N** and **GUISO N**. *Bordetella pertussis* and pertactin-deficient clinical isolates : lessons for pertussis vaccines **Expert Review of Vaccines**. (2014) Vol. 13 (9):1135-114

9. **GUISO N** and **HEGERLE N**. Other *Bordetella's,* lessons for and from pertussis vaccines. **Expert Review of Vaccines**. (2014) 13(9):1125-33

10. **GUISO N**. Pertussis vaccination and whooping cough. And now what ? **Expert Review of Vaccines.** (2014), vol 13(10):1163-5

11. POLAK M, ZAWADKA M, MOSIEJ E, RABCZENKO D, AUGUSTYNOWICZ E, **GUISO N** And LUTYNSKA A. Colonization of the lungs of naïve mice or mice immunized with pertussis whole-cell vaccines by *Bordetella pertussis* clinical isolates differing by PFGE types. **Arch. Immunol.**

Ther. Exp.. (2014) - [Epub ahead of print]

12. **HEGERLE N, DORE G, GUISO N**. Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. **Vaccine,** (2014), 32 (2014) 6597-6600

13. **GUISO N**. Bordetella. **Molecular Medical Microbiology**. Volume III (2014)

14. VAN GENT M, HEUVELMAN K, VAN DER H, HALLANDER H, ADVANI R, **GUISO N**, WIRSING VON KONIG C VESTRHEIM D, DALBY T, FRY N, PIERARD D, DETEMMERMAN L, ZAVADILOVA J, FABIANOVA K, LOGAN C. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries from 1998-2012. **JCMID,** (2014) - [Epub ahead of print]

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE

NA

Annexe 1 : Missions et Organisation du CNR

1.1 MISSIONS

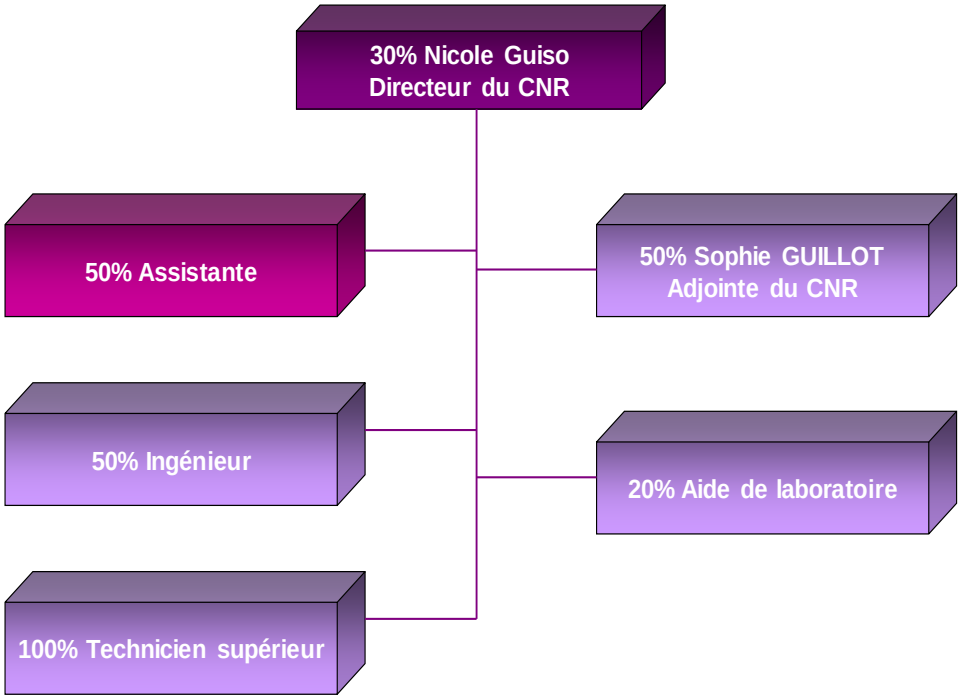
- Assurer une expertise microbiologique :
    - Poursuivre le développement de tests de détection rapide et/ou d'outils de diagnostic tardif de la coqueluche,
    - Vérifier la couverture des isolats de *B. pertussis* et d'autres *Bordetella* circulants par les différents vaccins commercialisés en France,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

1.2 EQUIPE

La composition de l'équipe du CNR et la qualification de chacun de ses membres sont représentées sur l'organigramme de la Figure 7. Ce CNR fait partie de l'unité de recherche PTMMH qui comprend aussi le CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*, et une équipe

de recherche avec un chef de laboratoire Institut Pasteur, un directeur de recherche au CNRS, un ingénieur, deux techniciens supérieurs, un stagiaire post-doctoral, deux étudiants en thèse et des stagiaires du réseau international des Instituts Pasteur.

Figure 7 : Organigramme en 2014



1.3 DEMARCHE QUALITE

Les objectifs de la politique qualité de notre entité sont indiqués dans la figure 9.

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

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

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 2014 :

→ Les changements réguliers au sein de l'équipe ainsi que l'évolution des techniques nous incitent, plus que jamais, à assurer le maintien des compétences et la transmission des savoirs au sein de l'unité. Sur ce point, l'unité sera donc particulièrement vigilante :
- à ce que chaque technique de l'unité soit partagée par au moins deux personnes. Ce transfert de savoir et de savoir-faire se fera notamment par le biais des habilitations et de la formation ;
- au renforcement des contrôles visant à assurer le maintien des compétences et à éviter les dérives dans la réalisation des techniques.

→ Nous porterons également nos efforts sur l'optimisation des performances (en termes de sensibilité et de spécificité) de nos techniques de PCR en temps réel et sur la mise au point de nouvelles techniques de PCR temps réel, d'analyses et comparaison de séquences génomiques, de transcriptomique et de protéomique.

→ Dans le cadre de ses missions de Centre National de Référence, l'unité cherchera à optimiser ses délais de caractérisation des isolats et de saisie des caractéristiques dans le système informatique LAGON. Ceci, dans le but de faciliter et de rendre plus efficace l'exploitation informatique ultérieure de ces informations, lors de la surveillance ou des expertises. Pour cela, chacun cherchera à optimiser l'organisation de son temps de travail via une planification plus efficace des manipulations et des saisies et à une meilleure prise en compte du risque de surcharge imprévue tel que les épidémies ou les cas en collectivité, en prévoyant notamment d'avantage de marges.

→ Enfin, les chercheurs et techniciens de l'unité porteront une attention particulière à la planification des expériences et au pilotage des projets via l'élaboration de protocoles d'expériences décrivant les objectifs du projet, les moyens et les techniques à mettre en oeuvre pour les atteindre, les résultats attendus et les risques de ne pas aboutir comme prévu (identification et prise en compte des freins probables).

→ Dans le cadre de la politique qualité des CNRs l'unité c'était fixée comme objectif, en 2013 l'application de la norme ISO 15189 (exigences particulières concernant la qualité et la compétence), pour les techniques de diagnostic moléculaire par PCR en temps réel des infections à *Bordetella* et par PCR en point final pour la détection du gène de la toxine diphtérique. Cet objectif a été atteint car les techniques mentionnées ont été accréditées sous le numéro 8-2588 en novembre 2013. Les objectifs fixés pour la suite sont l'accréditation ISO 15189 partielle vers la fin 2016 et complète avant le 1er novembre 2020 conformément à l'article 8 de la loi n° 2013-442 du mai 2013.

En tant que Responsable de l'unité, je m'engage :
- à garantir de bonnes pratiques professionnelles,
- à assurer la qualité de nos prestations au service de nos correspondants,
- à poursuivre la mise en place d'un système management de la qualité (SMQ) 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 29 août 2014

Historique :

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

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 du LREMS de l'Institut Pasteur :

Bilan des actions réalisées en 2014 :

- Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie) ;
- Mise à jour du manuel qualité (V2)
- Formations : WebCampus (utilisateur et administrateur) et Kalilab ;
- Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 ;
- Revue de direction LREMS ;
- Inclusion de la vague 3 (CNR Anaérobie, CNR Yersinia, CNR Mycose et antifongique et CNR *E. Coli*) dans la démarche d'accréditation ISO 15189.
- Création d'une vague 4 (CNR HPV et Vibrion Choléra)

Evènements d'importance en 2014 :

- Audit reporté en janvier 2015
- Mise à jour des pages web du CNR dans un format et en incluant des informations permettant d'être en adéquation avec les conditions imposées par la norme ISO 15 189

Perspectives 2015 :

- Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars à mai 2015
- Revue de direction LREMS : Mai 2015
- Finalisation dossiers de validation de méthode (3ème vagues) : Mars 2015

- Audit de suivi ISO 15189 version 2007 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : janvier 2015
- Audit ISO 15189 de renouvellement en version 2012 : juin 2015

Participation à un contrôle qualité externe :

En novembre 2014, nous avons participé à un contrôle qualité externe (QCMD) pour l'identification moléculaire de *Bordetella pertussis*. Le QCMD se composait de 12 échantillons à partir desquels il fallait détecter la présence ou non du matériel génétique de bactéries du genre *Bordetella* et dans un deuxième temps identifier l'espèce *pertussis* par typage moléculaire. La première étape a consisté à purifier l'ADN des 12 échantillons. Nous avons ensuite fait les PCR-TR qui ciblent l'IS*481* et l'IS*1001* (PCR très sensibles mais pas spécifiques d'une espèce donnée) et effectué une analyse qualitative. Nous avons obtenu des résultats très satisfaisants au niveau de l'identification du genre *Bordetella.*

Dans un deuxième temps, nous avons effectué le typage moléculaire par PCR-TR en utilisant différentes cibles spécifiques d'espèce (*ptx*A-Pr, h-IS*1001*, BP3385 et Fla). Nous avons aussi obtenu des résultats très satisfaisants pour l'identification des différentes espèces dont *Bordetella pertussis*.

ANNEXE 2 : Capacités Techniques du CNR

2.1 IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES BACTERIES DU GENRE BORDETELLA

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

- Dans le cas où l'identification de l'isolat est difficile, comme c'est le cas pour certaines espèces de bactéries du genre *Bordetella,* en raison du manque de caractères biochimiques ou de caractères inhabituels, nous réalisons la séquence de l'ADNr 16S. ***Le séquençage de l'ADN génomique qui est nécessaire pour permettre l'identification des isolats est réalisé par la plate-forme de séquençage Sanger Eurofins COCHIN.***

2.2 CONSTITUTION D'UNE COLLECTION

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

La durée de conservation des isolats est testée régulièrement. Elle est au moins de 10 ans en milieu BSA-SPG à -80°C. Nous avons mis en place, en parallèle de la cryoconservation en milieu BSA/SPG, des tests de cryopréservation avec des billes en céramique. Ce procédé nécessite moins de tubes de stockage par isolat et permet ainsi un gain de place à -80°C. Cependant, la durée de conservation des différentes espèces de *Bordetella* n'est pas formellement établie. Les premiers tests sont satisfaisants mais nous allons refaire des tests de viabilité dans un an. En fonction des résultats obtenus, des tests seront refaits chaque année afin d'établir la durée de conservation des Bordetelles avec les billes en céramique.

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

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

macrolides et du trimétoprime/sulfamétoxazole.

- **PCR en temps réel :**

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

  - **L'IS*481*** qui permet la détection des espèces *pertussis* et *holmesii* mais aussi assez souvent *bronchiseptica* ;
  - Le promoteur de la toxine de pertussis **(ptxA-Pr)** qui est spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'IS*481* ;
  - Le gène BP335 qui permet la détection de l'espèce pertussis et quelquefois l'espèce *B. bronchiseptica*
  - **L'IS*1001*** qui permet la détection de l'espèce *parapertussis* mais aussi quelquefois l'espèce *bronchiseptica* ;
  - **L'h-IS*1001*** qui permet la détection spécifique de l'espèce *holmesii*
  - **La FLA** en 2 temps qui permet la détection spécifique de l'espèce *parapertussis* et la détection différentielle de *B.bronchiseptica*.

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