

UMR 7278-IRD 198-INSERM U1095



Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella*

Professeur Pierre-Edouard FOURNIER
Directeur

RAPPORT D'ACTIVITE 2015



Faculté de Médecine – 27, boulevard Jean Moulin –
13005 MARSEILLE

Sommaire

RESUME ANALYTIQUE DES ACTIVITES 2015	2
1 – MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	5
1.1. – Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR	5
1.2. – Liste des personnels impliqués dans les thèmes de recherche du CNR.....	5
1.3. – Locaux et équipements du CNR	8
1.3.1. Les locaux	8
1.3.2. Equipement	11
1.4. – Description de la démarche qualité du laboratoire.....	14
2 – ACTIVITÉS d'EXPERTISE	15
2.1. – Organisation des plateformes techniques du CNR.....	16
2.2. – Activité de sérologie	20
2.3. – Activité de détection moléculaire.....	22
2.4. – Activité de culture	23
2.5. – Souchier de microorganismes fastidieux	24
2.6. – Réseau de partenaires.....	29
2.7. – Coopérations institutionnelles	29
2.8. – Rapports avec les pays étrangers	30
3 – ACTIVITÉ de SURVEILLANCE	32
3.1. – Réseau de partenaires.....	33
3.1.1. Collaboration avec l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail	33
3.1.2. Collaborations avec l'ECDC	33
3.1.3. Collaborations avec l'ESCMID	34
3.2. – Facturation de analyses	34
3.3. – Surveillance des rickettsioses, de la fièvre Q et des bartonelloses	35
3.3.1. Diagnostic de la fièvre Q	35
3.3.2. Diagnostic des rickettsioses	39
3.3.3. Diagnostic des bartonelloses	42
3.3.4. Représentativité des données du CNR	46
3.3.5. Enquête sur les moyens diagnostiques de la fièvre Q en France	46
3.4. – Contribution à la surveillance nationale	48
3.5. – Surveillance de la résistance aux antibiotiques	48
4 – ACTIVITÉS d'INFORMATION, de FORMATION et de CONSEIL	49
4.1. – Former et enseigner les maladies infectieuses et les maladies tropicales	50
4.2. – Formation permanente	52
4.4. – Le site Web	53
5 – TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS	55
5.1. – Travaux en cours.	56
5.2. – Publications 2015.....	58
5.3. – Communications 2015	60

RESUME ANALYTIQUE DES ACTIVITES DE L'ANNEE 2015

En 2015, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* a reçu **14278** échantillons de sérum provenant de **11359** patients. Tous les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps contre *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. et *Bartonella* sp. De plus, 7568 échantillons biologiques divers provenant de 4905 patients ont été reçus pour culture et/ou détection moléculaire. Pour les diagnostics de rickettsiose, fièvre Q et bartonellose, les échantillons de sérum étaient adressés comme demandes primaires dans 71,3, 59,3 et 62,4%, respectivement. L'année 2015 n'a été marquée par aucune épidémie des maladies infectieuses surveillées par le CNR, notamment aucune épidémie de fièvre Q. En 2015, le CNR a diagnostiqué **218** nouveaux cas de fièvre Q aiguë (+ 4% par rapport à 2014), **51** nouveaux cas de fièvre Q chronique (+ 19% par rapport à 2014), **63** nouveaux cas de rickettsioses (+21% par rapport à 2014) et **163** nouveaux cas de bartonelloses (- 9% par rapport à 2014).

En ce qui concerne la fièvre Q, nous avons observé en France métropolitaine une stabilité du nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë entre 2014 et 2015 (170 vs 171 cas, respectivement) mais une augmentation du nombre de diagnostics de formes focalisées de la fièvre Q (fièvre Q chronique) de 33 à 42 cas (+27%). En Guyane française, le nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë a augmenté entre 2014 et 2015, passant de 33 à 43 cas (+30%). Dans ce département, nous avons conduit plusieurs études spécifiques, dont celle de la saisonnalité de la maladie, qui est corrélée à la saison des pluies (avril-juin) et au cycle de reproduction du paresseux à trois doigts (*Bradypus tridactylus*), confirmant cet animal comme réservoir de *Coxiella burnetii* à Cayenne [17]. Nous avons également étudié la sensibilité aux antibiotiques des souches de *C. burnetii* guyanaises [7]. Ces souches, qui appartiennent à un seul génotype (MST 17) qui est spécifique de la Guyane, sont toutes sensibles à la doxycycline qui demeure donc l'antibiotique de référence contre la fièvre Q dans ce département [7]. Enfin, devant le constat que la fièvre Q était responsable de 24% des pneumonies en Guyane française, nous avons analysé le génome de l'une des souches guyanaises (Cb175) à la recherche de caractères génétiques associés à cette virulence [15]. La différence la plus marquante avec d'autres souches de *C. burnetii* d'autres zones géographiques est la perte spécifique par les souches guyanaises du système de sécrétion de type I (toutes les souches guyanaises testées ont cette délétion).

Par ailleurs, nous avons observé que les patients atteints d'endocardite à *C. burnetii* avaient une diminution du nombre de cellules NK CD56dim, ce qui pourrait expliquer une diminution de l'efficacité de la réponse médiée par l'interféron γ contre l'infection [19]. Nous avons également montré l'utilité du TEP-scanner dans le diagnostic des infections vasculaires à *C. burnetii* [2]. En ce qui concerne les infections spécifiques, nous avons poursuivi des collaborations internationales sur les étiologies des endocardites à hémocultures négatives et observé en Thaïlande un ratio plus élevé de

cas causés par des agents zoonotiques, dont *C. burnetii* et *Bartonella henselae*, par rapport à la France [23]. Au Laos, en revanche, nous n'avons pas identifié de cas d'endocardite à *C. burnetii* [24]. Pour ce qui est des péricardites, nous avons détecté *C. burnetii* comme agent causal chez seulement 2 des 933 patients admis à l'hôpital de la Timone avec une péricardite aiguë de 2007 à 2012, en faisant un agent rare de cette maladie [18]. Enfin, nous avons décrit la présence de *C. burnetii* dans des tiques en Ethiopie [6] et publié une mise à jour des connaissances sur la fièvre Q [16].

Au cours de l'année 2015, nous avons eu moins de diagnostics d'infections à *Bartonella* par rapport à 2014, avec 163 patients (-9%), dont 143 maladies des griffes du chat et 18 endocardites. Par rapport à 2014, le nombre de diagnostics de maladie des griffes du chat a été très supérieur (137 vs 99, +48%) mais le nombre de diagnostics d'endocardites très inférieur (18 vs 60, -70%), sans que les méthodes diagnostiques n'aient changé. Par ailleurs, le CNR a publié une étude de 106 cas d'endocardites à *Bartonella* diagnostiqués de 2005 à 2013, permettant d'évaluer la sensibilité de la sérologie par immunofluorescence ou western blot et de la PCR à partir du sang, du sérum ou des valves à 58, 100, 33, 36 et 91%, respectivement [28]. Nous avons également étudié le rôle des puces dans la transmission à l'homme des *Bartonella* et des *Rickettsia* à la Réunion. Au total, 12% des puces de rat *Xenopsylla* étudiées étaient infectées, et 1/3 des rongeurs collectés étaient porteurs d'au moins une puce infectée [22], montrant le risque que représentent ces maladies pour la population réunionnaise. Nous avons également montré la capacité des punaises de lit *Cimex lectularius* à être réservoir de *Bartonella quintana*, l'agent de la fièvre des tranchées [10, 13], ce qui suggère qu'elles peuvent potentiellement jouer un rôle dans l'épidémiologie de la bactérie. Enfin, nous avons identifié la présence de *Bartonella quintana* dans un nouveau génotype de *Pediculus humanus* collecté en République Démocratique du Congo [5]. Par ailleurs, nous avons fait une revue de la littérature sur toutes les évidences scientifiques d'infections à *Bartonella* au cours de l'histoire humaine [8].

Pour ce qui est des rickettsies, le nombre de diagnostics de rickettsioses faits au CNR a augmenté, avec 63 diagnostics (vs 52 en 2014, +21%), mais la répartition des agents étiologiques est similaire (17 infections à *Rickettsia africae* en 2015 vs 13 en 2014, 12 fièvres boutonneuses méditerranéennes vs 8, 12 SENLAT vs 8, 11 infections à *Rickettsia sibirica* subsp. *mongolitimonae* vs 13, 5 cas de typhus murins vs 7). Par ailleurs, l'année 2015 a été marquée par la mise au point de nouveaux outils diagnostiques pour les rickettsioses. En effet, nous avons adapté la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à l'identification non seulement des tiques trouvées sur les patients ou dans l'environnement et adressées à notre laboratoire [12, 21], mais aussi des espèces de rickettsies véhiculés par ces tiques. Cette méthode rapide et peu coûteuse permet d'optimiser l'identification de ces bactéries de culture difficile et la prise en charge des patients piqués par ces arthropodes. Au niveau français, nous avons également montré la présence de *R. typhi* à la Réunion au travers de 8 cas autochtones de typhus murin [25], décrit un cas autochtone grave d'infection à *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* compliqué de coagulation intra-vasculaire disséminée dans le Gard [29], un cas de typhus des broussailles sévère avec détresse respiratoire chez une patiente de retour d'un voyage au Laos [26], un cas de typhus murin chez une patiente de retour de Tunisie [31] et la présence

d'*Anaplasma platys* dans le sang de 15% des chiens en Guyane, montrant leur forte exposition aux ehrlichioses [20]. Nous avons également collaboré avec plusieurs équipes à l'étranger et mis en évidence le rôle causal de *R. felis* dans 10.2% des cas de fièvre chez l'enfant au Gabon [4] ainsi que la possible transmission de cette espèce par les moustiques *Anopheles gambiae* [1, 11]. Nous avons décrit le premier cas d'infection à *Rickettsia africae* chez un patient polonais de retour d'un voyage en Afrique du Sud [3] et montré la responsabilité des rickettsioses (typhus de broussailles, typhus murin, rickettsioses boutonneuses) dans 4% des fièvres en zone rurale au Laos [9]. Nous avons également montré l'infection des chiens par *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys* en Kabylie [27] et la présence de *Rickettsia aeschlimanii*, *R. africae* ou *R. massiliae* dans des tiques collectées en Egypte [30]. Enfin, nous avons collaboré à une revue avec des équipes ANSES, Inserm et INRA sur l'utilité d'une approche « one health » dans la lutte contre les maladies transmises par les tiques [14].

1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR

Le Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* (CNR), créé en 1985, a vu son agrément renouvelé par le ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé pour la période du 1^{er} janvier 2012 au 31 décembre 2016 (JORF n°302 du 30-12-2011, p.22804, texte n°60). Le CNR reçoit plus de **20 000** prélèvements (sérum, sang, biopsies diverses et arthropodes) par an de plus de **300 laboratoires** publics et privés de France et de nombreux pays étrangers afin d'effectuer le diagnostic d'infections à bactéries intra-cellulaires de culture difficile. Le CNR diagnostique les infections causées par les différentes espèces de rickettsies, *Coxiella burnetii* et *Bartonella*.

Les missions du CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* incluent :

- Le diagnostic sérologique, par culture et moléculaire des infections causées par les bactéries des genres *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Anaplasma* et *Ehrlichia*
- L'expertise concernant la microbiologie et la pathogénie des bactéries des genres *Rickettsia*, *Coxiella* et *Bartonella*
- La contribution à la surveillance épidémiologique des maladies causées par ces bactéries
- L'alerte par l'information immédiate de Santé Publique France et du ministère de la Santé de toute constatation pouvant avoir des répercussions sur l'état sanitaire de la population
- Le conseil des pouvoirs publics, des agences de sécurité sanitaire et des professionnels de santé

Un site web permettant de consulter l'ensemble des fiches d'information sur les domaines d'expertise du CNR est accessible à l'adresse suivante :

<http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=349&titre=centre-national-de-reference-des-rickettsia-coxiella-et-bartonella>

1.2 Liste des personnels impliqués dans les thèmes de recherche du CNR

Enseignants chercheurs et chercheurs

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers (Université Aix-Marseille – Assistance Publique/Hôpitaux de Marseille)

Philippe Brouqui
Florence Fenollar
Pierre-Edouard Fournier
Hubert Lepidi
Jean-Louis Mège
Philippe Parola
Didier Raoult
Andreas Stein

Chargés de Recherche CR1

(CNRS)

Eric Ghigo

**Maîtres de Conférence – Praticiens Hospitaliers
(Université Aix-Marseille – Assistance Publique/Hôpitaux de Marseille)**

Jean-Christophe Lagier
Matthieu Million

**Maîtres de Conférence – Chaire Exceptionnelle
(CNRS)**

Vicky Merhej

**Maîtres de Conférence – Chaire Exceptionnelle
(IRD)**

Fadi Bittar

**Maîtres de Conférence
(Université Aix-Marseille)**

Gérard Aboudharam

**Chargés de Recherche CR2
(IRD)**

Oleg Mediannikov

Ingénieurs et Equipe Technique

Ingénieurs de Recherche

Gilles Audoly (Inserm)
Said Azza (Université Aix-Marseille)
Yassina Bechah (Inserm)
Khalid El Karkouri (Université Aix-Marseille)
Catherine Robert (Université Aix-Marseille)
Dipankar Bachar (CNRS)

Ingénieurs d'étude

Marielle Bedotto (Assistance Publique / Hôpitaux de Marseille)
Caroline Blanc-Tailleur (Université Aix-Marseille)
Aurelia Caputo (Assistance Publique / Hôpitaux de Marseille)
Malgo Kowalczywska (Université Aix-Marseille)
Jérémy Delerce (Assistance Publique / Hôpitaux de Marseille)
Claude Nappez (Université Aix-Marseille)

Techniciens

Annick Abeille
Bernard Amphoux
Lina Barassi
Jean-Michel Berenger
Audrey Borg
Catherine Brossard
Julie Colin
Olivier Costagliola
Emilie Doudon
Magali Dulac
Michèle Estel
Clio Grimaldier
Thierry Gros
Priscilla Jardot

Stéphanie Junoy
Noemie Labas
Marion Le Bideau
Gilles Liotaud
Marie-Charlotte Mati
Evelyne Nguyen
Jean-Yves Patrice
Céline Perreal
Pascale Raymond
Magali Richel
Julie Rodriguez
Laurence Thomas
Emeline Vial

Cadres médicaux Assistance Publique / Hôpitaux de Marseille

Gilbert Caruso
Véronique Filosa
Ginette Florentz
Laure Gambarelli
Karine Puggioni

Equipe administrative

Cadres administratifs et administratifs Assistance Publique / Hôpitaux de Marseille

Priscilla Barraco
Ivana Domingo
Marion Fernandez
Valérie Filosa
Sandrine Longinotti
Olga Loukhneva
Abdelkrim Ouanezar
Caroline Touati

Administratifs Université Aix-Marseille

Isabelle Combe
Cathy Corona

Administratifs CNRS

Francine Vérin

Gérard ABOUDHARAM, Pierre-Edouard FOURNIER, Bernard LA SCOLA, Jean-Louis MEGE, Didier RAOULT et Jean-Marc ROLAIN possèdent une autorisation d'expérimentation animale permettant de conduire des recherches dans les deux animaleries A3 du laboratoire. Les activités de sérologie du CNR font l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2007) sous la référence 8-3446 rév 0. Le Pr Fournier possède une habilitation pour la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous la référence ADE-021722012-9).

1.3 Locaux et équipement du CNR

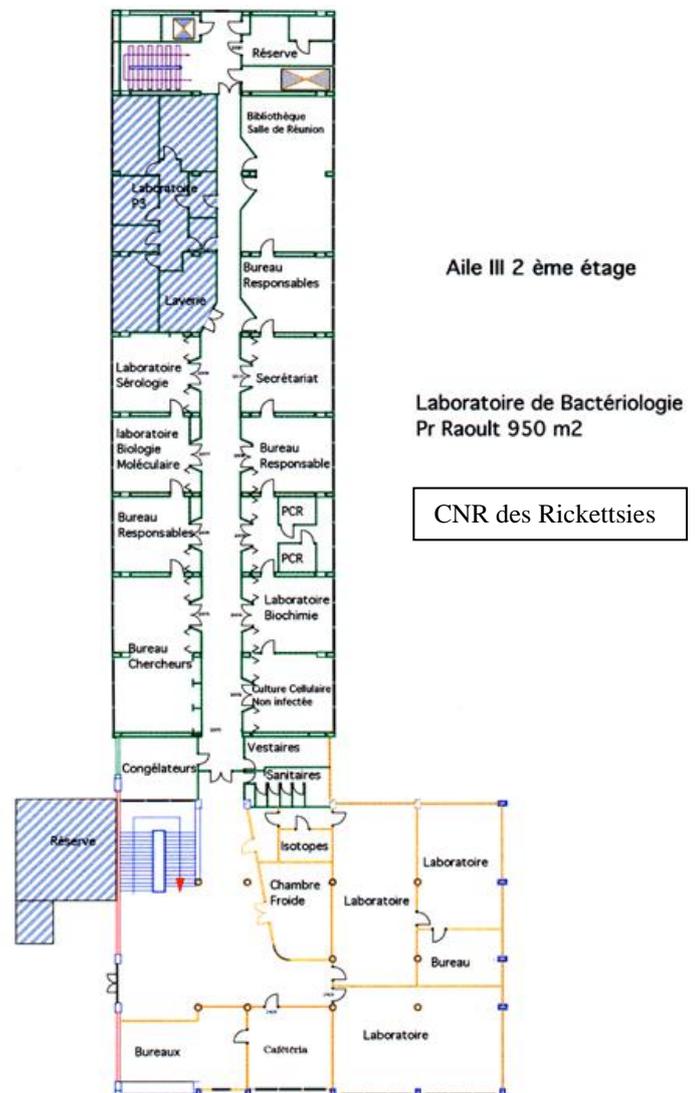
1.3.1 Les locaux

Le laboratoire dédié au CNR occupe tout le deuxième étage de l'aile III de la Faculté de Médecine de Marseille, ainsi que les pièces adjacentes et le laboratoire NSB3 commun, pour une surface de 1 590 m².

Le laboratoire occupe également une aile du 3^e étage, et une partie du 4^e étage. La surface totale s'étend actuellement sur 2 667m². Au sein du laboratoire se situent les bureaux des responsables médicaux, le secrétariat pédagogique, le service financier et le secrétariat, la bibliothèque/salle de réunion, le laboratoire P3, des laboratoires de sérologie, de biologie moléculaire, de préparation PCR, avec deux boxes fermés, de biochimie, et de culture cellulaire non infectée ou infectée par des pathogènes de niveau 1 ou 2, une pièce dédiée aux congélateurs, sécurisée (basculé automatique sur des réserves de CO₂ en cas de rupture du froid, une réserve et un vestiaire.

A l'extérieur de cette entité se trouvent trois laboratoires (immunologie - physiopathologie, biologie moléculaire et sérologie), les bureaux des ingénieurs bioinformaticiens et des cadres administratifs, la cafétéria – salle de détente, une chambre froide, la pièce réservée aux isotopes, ainsi qu'une réserve et un autre vestiaire.

Au troisième étage se trouve le laboratoire de biologie moléculaire dédié aux activités de séquençage génomique et métagénomique. L'équipe génomique-protéomique occupe également l'aile rouge au



troisième étage, où se trouvent également trois bureaux pour des étudiants. Au 6^{ème} étage se trouve l'insectarium où sont confinés les élevages de tiques, puces et poux.

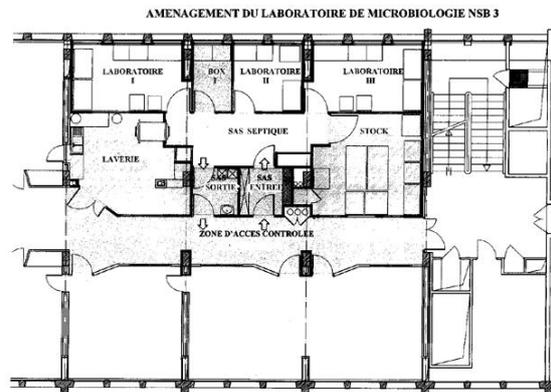
Tous les accès au laboratoire central, au P3, à toutes les pièces ouvrant sur les parties communes de la faculté ainsi que certaines pièces intérieures sont soumises à différents niveaux de contrôle par des cartes magnétiques, fabriquées et gérées en interne par un logiciel spécifique.

Laboratoire de Sécurité biologique NSB3 du CNR

Le laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 3 (NSB 3) du CNR, situé au 2nd étage de la Faculté de Médecine, dans l'aile verte, est constitué de zones à atmosphère contrôlée (ZAC), au sein desquelles sont manipulés des prélèvements biologiques pathogènes, des animaux infectés et des micro-organismes de classe 3.

Ce laboratoire a une surface totale de 105 m². Il est constitué de 9 ZAC en dépression par rapport à l'extérieur (Cf. schéma) pour éviter tout transfert des micro-organismes de l'intérieur vers l'extérieur du laboratoire :

- Sas entrée : - 20 Pascals
- Sas sortie : - 20 Pascals
- Sas septique : - 60 Pascals
- 3 laboratoires : - 40 Pascals
- box : - 40 Pascals
- salle stock : - 40 Pascals
- laverie : - 20 Pascals



Des afficheurs, localisés dans la zone d'accès contrôlé et dans le sas septique, permettent de visualiser les dépressions régnant dans les différentes zones. Une centrale de traitement d'air, installée sur le toit du bâtiment, assure :

- le soufflage d'air neuf, après passage sur différents filtres de dépoussiérage, dans le laboratoire avec un taux de renouvellement horaire de 25 volumes par heure.
- l'extraction de l'air des différentes zones du laboratoire, qui passe sur 2 batteries de filtres absolus (HEPA) de façon à empêcher tout relargage dans l'environnement de germes provenant du laboratoire.

Les 3 sas sont équipés de téléphones permettant de communiquer avec l'extérieur. Les sas entrée et sortie sont pourvus de portes asservies électriquement, empêchant leur ouverture simultanée. Un banc de passage est installé dans le sas entrée permettant au personnel, après la mise de surchausses, de revêtir les vêtements de protection (combinaison, charlotte, gants et tabliers plastiques). Le sas sortie est équipé d'un lavabo à commande par infrarouge. Les effluents liquides sont collectés dans des bacs de rétention et décontaminés par voie chimique. Un passe-cassette,

situé entre le sas septique et la laverie, assure l'entrée et la sortie du matériel après décontamination par voie chimique. Les surfaces (sols, murs et plafonds) sont lisses, pour une facilité de nettoyage et une décontamination efficace. Entre le sas septique et la laverie se trouve un autoclave (Subtil Crépieux) à double entrée, qui assure la décontamination des déchets liquides et solides ainsi que du matériel contaminé.

Laboratoire commun de microbiologie NSB 3

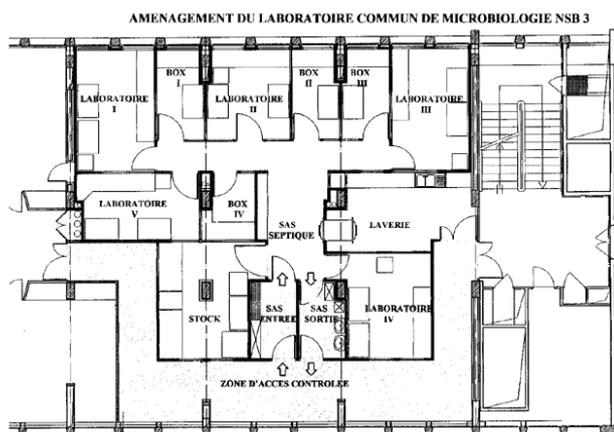
Outre le laboratoire NSB3 propre, le CNR a accès au laboratoire NSB3 commun, situé au 3^{ème} étage de la Faculté de Médecine, dans l'aile verte, est constitué de zones à atmosphère contrôlée (ZAC), au sein desquelles sont manipulés des prélèvements biologiques pathogènes, des animaux infectés, des micro-organismes de classe 3 ainsi que des OGM.

Cette structure se caractérise, par rapport aux autres laboratoires NSB 3, par sa capacité à :

- recevoir plusieurs équipes de recherche en parallèle,
- abriter une animalerie isotechnique A3.

Ce laboratoire a une surface totale de 160 m². Il est constitué de 14 ZAC en dépression par rapport à l'extérieur (Cf. schéma) pour éviter tout transfert de micro-organismes de l'intérieur vers l'extérieur du laboratoire :

- sas entrée :	- 20 Pascals
- sas sortie :	- 20 Pascals
- sas septique :	- 40 Pascals
- 4 laboratoires :	- 60 Pascals
- 1 animalerie A3 :	- 60 Pascals
- 4 boxs :	- 60 Pascals
- salle stock :	- 60 Pascals
- laverie :	- 10 Pascals



Des afficheurs, localisés dans la zone d'accès contrôlé et dans le sas septique, permettent de visualiser les dépressions régnant dans les différentes zones.

Une centrale de traitement d'air, installée sur le toit du bâtiment, assure :

- le soufflage d'air neuf, après passage sur différents filtres de dépoussiérage, dans le laboratoire avec un taux de renouvellement horaire de 20 volumes par heure.
- l'extraction de l'air des différentes zones du laboratoire, qui passe sur 2 batteries de filtres absolus (HEPA) de façon à empêcher tout relargage dans l'environnement de germes provenant du laboratoire.

Les 3 sas sont équipés de téléphones permettant de communiquer avec l'extérieur.

Les sas entrée et sortie sont pourvus de portes asservies électriquement, empêchant leur ouverture simultanée.

Un banc de passage est installé dans le sas entrée permettant au personnel, après la mise de surchausses, de revêtir les vêtements de protection (combinaison, charlotte, gants et tabliers plastiques).

Le sas sortie est équipé de 2 lavabos à commande par infra-rouge. Les effluents liquides sont collectés dans des bacs de rétention et décontaminés par voie chimique.

Un passe-cassette, situé entre le sas septique et la laverie, assure l'entrée et la sortie du matériel après décontamination par voie chimique.

Les surfaces (sols, murs et plafonds) sont lisses, pour une nettoyabilité et une décontamination efficace.

Entre le sas septique et la laverie se trouve un autoclave (Lequeux) à double entrée, avec joints auto-gonflants, qui assure la décontamination des déchets liquides et solides ainsi que du matériel contaminé. Le volume de la chambre est de 450 litres. Cet autoclave piloté par informatique possède plus de 10 cycles différents de stérilisation. Toutes les données d'un cycle après stérilisation sont imprimées de façon à assurer une traçabilité des destructions réalisées.

1.3.2. Equipement

1. Sérologie

- 1 étuve ThermoScientific (Aerus)
- 1 congélateur antigènes -80°C
- 20 congélateurs sérums -80°C
- 1 réfrigérateur
- 3 ordinateurs
- 1 imprimante en réseau
- 2 microscopes à fluorescence (Zeiss)
- 1 microscope à fluorescence (Olympus)

2. Biologie moléculaire – séquençage génomique

- 1 pyroséquenceur GS FLX Titanium (Roche)
- 1 pyroséquenceur GS FLX XL (Roche)
- 1 pyroséquenceur GS Junior
- 1 pyroséquenceur Ion Torrent (Applied Biosystems)
- 2 pyroséquenceurs MiSeq (Illumina)
- 2 séquenceurs 3130 (Applied Biosystem)
- 1 SmartCycler
- 10 Thermocyclers conventionnels (Applied biosystems, Eppendorf, Biometra)
- 5 thermocycleurs en temps réel CFX 96 (BioRad)
- 5 extracteurs d'ADN EZ-One (QIAGEN)
- 5 broyeur Fastprep
- 1 bain sec
- 1 Hydroshear (GeneMachines)
- 7 hottes BIOCAP DNA (Bioblock)
- 1 appareil à électroporation (Biorad)

- 1 Chambre UV + Camera CCD Quantum (Appligene)
- 6 cuves de migration / gels PCR (Eurogentec)
- 5 thermocycleurs (Applied Biosystem)
- 1 table UV + Imager (Appligene)
- 1 appareil pour électrophorèse à champ pulsé (Biorad)
- 1 appareil à électroporation (Biorad)
- cuve «vacuum blotter » (Biorad)
- 1 four à hybridation (Appligene)
- 1 hotte chimique (Kötterman)
- 1 Bioanalyser (Agilent)
- 1 extracteur Fast Prep (Savant)
- 1 speed vac (Savant)
- 1 centrifugeuse Beckman à plaque (Allegra X- 15R)
- 1 coulter Beckman Z2
- Lyophilisateur Cosmos 2 (Cryotec)

3. Biologie cellulaire

- 1 thermoshake (Ed Bühler)
- 1 ultra-centrifugeuse de paillasse (Beckman)
- 1 hotte à flux laminaire
- spectrofluorimètre pour plaques (Bio-Teck)
- 1 thermoshake (Gerhardt)
- 2 spectrophotomètres (Beckman, Shimadzu)
- broyeur de cellules (Bioblock)
- bombe à cavitation
- UV crosslinker (Bioblock)
- incubateurs à CO₂
- étuves sèches
- four Pasteur
- 4 hottes à flux laminaire
- 1 sorbonne (Kotterman)
- 1 compteur à scintillation (Packard)
- récupérateur de cellules (Wesbart)
- détecteur de radioéléments

4. Microscope pour l'étude morphologique et fonctionnelle des cellules

- Microscopes inversés
- 3 microscopes optiques (dont 2 avec appareil photo)
- 3 microscopes à fluorescence
- loupe binoculaire avec camera
- microscope confocal (Leica)
- microscope biphotonique (Leica)

5. Culture en laboratoire NSB3 du CNR

- 1 PSM (Holten LaminAir)

- 1 PSM HeraSafe (Heraeus)
- 1 bain-marie (Firlabo)
- 1 centrifugeuse (Heraeus)
- 1 microscope inversé (Zeiss)
- 1 microscope à fluorescence (Olympus)
- 1 Cytospin 4 (Thermo Scientific)
- 3 incubateurs secs
- 2 incubateurs à Co2 HeraCell 240 (Heraeus)
- 1 poste informatique
- 1 réfrigérateur – congélateur à -20°C
- 3 microscopes optiques (dont 2 avec appareil photo)
- 3 microscopes à fluorescence
- loupe binoculaire avec camera
- microscope confocal (Leica)
- microscope biphotonique (Leica)
- Spectrometre de masse MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics)

6. Dans le laboratoire NSB3 commun

- 1 PSM (Holten LaminAir)
- 1 PSM HeraSafe (Heraeus)
- 1 bain-marie (Firlabo)
- 1 centrifugeuse (Heraeus)
- 1 microscope inversé (Zeiss)
- 1 microscope à fluorescence (Olympus)
- 1 Cytospin 4 (Thermo Scientific)
- 3 incubateurs secs
- 2 incubateurs à Co2 HeraCell 240 (Heraeus)
- 1 poste informatique
- 1 réfrigérateur – congélateur à -20°C
- 3 microscopes optiques (dont 2 avec appareil photo)
- 3 microscopes à fluorescence
- loupe binoculaire avec camera
- microscope confocal (Leica)
- microscope biphotonique (Leica)

Nous avons 2 boxes et 1 laboratoire dédiacés, nous possédons :

- 3 postes de sécurité microbiologique de type II
- Armoire chauffante pour animaux de laboratoire
- Etuve à CO₂
- Bain-marie
- 2 réfrigérateurs-congélateurs

et nous partageons avec les autres équipes :

- Microscope optique
- Microscope inversé

- Congélateur à –80°C
- 3 centrifugeuses
- Ultracentrifugeuse
- Container à azote liquide
- Micro-ordinateur relié au réseau de la faculté avec imprimante et scanner

7. Equipement informatique propre au laboratoire

Les 240 ordinateurs du laboratoire sont équipés d'une connexion au réseau de l'Université avec accès libre à Internet. Il y a 20 imprimantes laser réseaux réparties sur tout le laboratoire.

Les 2 séquenceurs ainsi que le Lightcycler disposent chacun d'un ordinateur et d'une imprimante jet d'encre couleur, les 5 CFX sont chacun équipés d'un ordinateur.

Les Bioinformaticiens disposent de 8 stations de travail très haute performance (multicoeur, 12 Go de Ram minimum).

1 serveur de sauvegarde est à disposition sur le réseau, d'une capacité de 15 To, chaque utilisateur peut avoir un compte réservé.

A disposition également, 1 serveur de calcul partagé de 196 cœurs et 1 To de mémoire associé à 64 To de disque pour les calculs importants du laboratoire.

1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire

Le CNR s'est doté d'un guide de bonne exécution des analyses (GBEA) pour toutes les activités de culture et sérologie du laboratoire. Les activités de sérologie du CNR ont fait l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2007) sous la référence 8-3446 rév 0. Un GBEA a été rédigé pour les activités de de détection moléculaire. L'accréditation des activités de biologie moléculaire est prévue pour 2017, après le déménagement du CNR dans l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection. Chaque nouveau lot d'antigène de sérologie est testé avec des sérums témoins de titres connus. Chaque nouveau témoin positif de PCR est testé en dilution, de 1 à 10⁶ copies. La stérilité des lignées cellulaires servant de support de culture est testée chaque mois, en particulier à la recherche d'une contamination par mycoplasmes. Le CNR ne participe pour l'instant pas à un contrôle de qualité externe mais a proposé en 2016 aux laboratoires de microbiologie des CHU français, à l'occasion d'une enquête sur les moyens diagnostiques de la fièvre Q en France, d'en mettre en place un. Ces données sont détaillées dans le rapport d'activités.

2 – ACTIVITÉS d'EXPERTISE

2. ACTIVITES D'EXPERTISE

2.1 Organisation des plateformes techniques du CNR.

Les ressources techniques du laboratoire sont organisées autour de 7 pôles divisés en plateformes thématiques interdépendantes.

Chaque pôle comprend un encadrement scientifique par des chercheurs de l'unité, des ingénieurs et des techniciens. L'ensemble de l'équipe de chaque plateforme assure l'entretien, la formation aux utilisateurs, la collecte et l'analyse des résultats, le développement des nouvelles techniques, etc.

Les Plateformes

1. Animalerie, expérimentation animale et production d'anticorps
2. NSB3: Manipulation des germes pathogènes en milieu de biosécurité 3
3. Cultures spéciales
4. Maintenance des systèmes de froid et de stockage et Souchiers
5. Plateforme microscopie pour l'étude morphologique et fonctionnelle des cellules, cytométrie.
6. Plateforme Génomique et Protéomique
7. Plateforme Transcriptomique
8. Plateforme immunologie et macrophages
9. Plateforme biologie moléculaire
10. Plateforme Sérologie et Western -Blot
11. Plateforme Bioinformatique
12. Pôle administratif

A. Plateforme Animalerie (responsable Philippe Parola, PU-PH)

Personnels

(Jean-Michel Berenger, technicien AP-HM; Claude Nappez, ingénieur d'étude Université, Anne-Marie Gottreau, ADT, Université)

Depuis l'année 2011 le développement de la plateforme « Animalerie » a permis le développement des élevages d'arthropodes (tiques poux, puces, moustiques, punaises et triatomes) et des programmes de recherche sur les interactions "arthropodes – microorganismes". Elle a recruté un technicien entomologiste (*Jean-Michel Bérenger, AP-HM*), et une aide laboratoire (*Anne-Marie Gottreau, Université*).

Les élevages de tiques et de poux sont effectués sur lapins.

Les élevages de moustiques sont effectués sur souris mais aussi sur membranes artificielles.

Les élevages de puces, punaises, et triatomes sur membranes.

Les élevages de tiques, poux et puces infectés par des rickettsies s'effectuent en conditions de

sécurité microbiologique de niveau 3 (NSB3).

B. Laboratoire de sécurité biologique niveau 3 (responsable Bernard La Scola, PU-PH)

Personnels

Karine Puggioni (Cadre technique, AP-HM), Nathalie Wurtz (Ingénieur d'études, Université), Muriel Militello (technicienne, Université)

- Les laboratoires NSB 3 sont constitués de zones à atmosphère contrôlée, au sein desquelles sont manipulés des prélèvements biologiques pathogènes, des animaux infectés et des micro-organismes de classe 3. Les 2 entités sont le laboratoire NSB3 de l'unité des rickettsies et le laboratoire NSB3 commun de la faculté de médecine. Le responsable scientifique des 2 laboratoires est le Pr Bernard La Scola. Le responsable technique est Madame Nathalie Wurtz. le Pr Fournier a fait l'objet d'une habilitation pour la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous la référence ADE-021722012-9).
- Le laboratoire NSB3 de l'Unité des Rickettsies a une surface totale de 105 m². Il est constitué de 9 ZAC en dépression par rapport et l'accès est contrôlé. Laboratoires et box sont équipés d'un matériel de base comprenant des Postes de Sécurité Microbiologique de type II, conformes à la norme NF X44-201 et qualifiés une fois par an au minimum (Tech Gen, Flux France). Ce laboratoire est dévolu au diagnostic microbiologique des infections liées aux bactéries de classe 3 en culture cellulaire. Les autres activités réalisées dans ce laboratoire sont la production de masse des bactéries de classe 3 en culture cellulaire utilisée ensuite comme antigènes de sérologie, comme témoins positif pour la détection moléculaire et pour les analyses de génomique et de protéomique.
- Le laboratoire NSB 3 commun de la faculté de médecine a une surface totale de 160 m². Il est constitué de 14 ZAC en dépression par rapport à l'extérieur avec une surveillance comparable à celle de celui de l'unité des Rickettsies. Il se caractérise, par rapport à celui de l'unité des rickettsies par sa capacité à abriter des animaux (souris, rats, cobayes, lapins) et des arthropodes (tiques, poux, puces) infectés par des bactéries de classe 3. Enfin il se caractérise par la présence d'un lyophilisateur ainsi que l'ensemble des équipements du souchier NSB3 (ampoules lyophilisées sous coffre, azote et -80°C). C'est dans ce laboratoire que sont réalisées toutes les expérimentations animales avec les agents de classe 3.

C. Plateforme Gestion du Froid et Souchiers (responsable Pierre-Edouard Fournier, PU-PH)

Le CNR conserve depuis de nombreuses années les souches bactériennes d'espèces de culture fastidieuse, en particulier intra-cellulaires strictes ou facultatives : *Rickettsia* sp., *Bartonella* sp., *C. burnetii*.

A ce jour, plus de 1500 souches bactériennes sont conservées. L'importance de cette collection, la Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies:

(CSUR, WDCM 875, <http://www.mediterranee-infection.com/article.php?leref=14&titre=collection-de-souches>), est d'autant plus grande que la majorité de ces souches est unique. Cette collection conserve actuellement 662 souches de *Bartonella*, 215 souches de *Rickettsia* et 235 souches de *Coxiella burnetii*, constituant les plus grandes collections mondiales de souches des bactéries de ces trois genres bactériens. Témoins de son implication dans la conservation et l'étude des bactéries de culture difficile, la majorité des nouvelles espèces de *Rickettsia* décrites officiellement depuis 2001 (*R. heilongjiangensis*, *R. asiatica*, *R. tamurae*, *R. raoultii*) ont été décrites par le CNR. La pérennisation de cette collection est donc particulièrement cruciale.

Conservation sécurisée des souches bactériennes

A- Situation actuelle

La conservation des souches bactériennes est actuellement essentiellement réalisée en congélateurs à -80°C et azote liquide. La gestion des stocks est réalisée manuellement, avec étiquetage des tubes et saisie de l'état des stocks en fichier Excel. Ce type de conservation par une seule méthode expose au risque de perte des souches en cas de panne mécanique ou électrique des congélateurs. Par ailleurs, l'étiquetage de chaque tube expose au risque de vol.

B- Objectifs

L'objectif avec le transfert dans l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection est de multiplier et sécuriser les moyens de conservation des souches bactériennes, avec un système de traçabilité optimisé permettant un suivi très précis des souches conservées.

C- Moyens prévus.

Il est prévu de multiplier les moyens de conservation, avec l'acquisition d'une biobanque automatisée permettant de stocker 1 million d'échantillons et souches à -80°C et 2 millions à -20°C. Les souches seront également conservées en azote gazeux à -196°C et sous forme lyophilisée à -20°C. Chaque appareil de congélation est équipé d'un système d'alarme visuelle et sonore qui envoie en cas de problème un message d'alarme aux agents de sécurité de la Faculté de Médecine de Marseille puis de prochainement l'IHU. De plus, les tubes dans lesquels sont conservées les souches sont anonymisés et identifiés par des codes-barres uniques reconnus par un lecteur automatisé. L'avantage d'un tel système est, outre l'anonymisation des tubes qui renforce la sécurité, est de permettre une traçabilité accrue de chaque tube et d'assurer une gestion optimisée des stocks. Une pièce de 200 m² sécurisée par cartes d'accès sera dédiée à la biobanque au sein de l'IHU.

D. Plateforme Microscopie pour l'étude morphologique et fonctionnelle des cellules (responsable Eric Ghigo, CR1 CNRS)

Personnels

Pascal Weber (Ingénieur d'Etude, CNRS), Audrey Borg (Technicien, AP-HM), Audrey Aversa (Technicien, AP-HM).

Description

Cette plateforme comprend trois parties: A) Les systèmes d'acquisition d'images, comptages, et microdissection. B) Les outils d'analyse et reconstruction d'images en 3D. C) Les bases de données des images produites dans notre laboratoire. Le matériel de cette plateforme est listé au paragraphe 1.3.2.4.

E. Plateforme Génomique (Responsable Pierre-Edouard Fournier, PU-PH).

Personnels

Catherine ROBERT (Ingénieur de Recherche, Université), Noemie LABAS (Technicien Université), Thi-Tien NGUYEN (Technicienne, AP-HM), Caroline BLANC-TAILLEUR (Ingénieur Université)

La plateforme est spécialisée dans le séquençage génomique des génomes bactéries intra-cellulaires et de virus. Cette activité en fait le premier centre de séquençage des microorganismes d'intérêt médical en France en termes de volume et d'impact des publications scientifiques, et la huitième plateforme au niveau mondial dans le domaine de la production et de la valorisation des génomes microbiens. En 2015, 206 génomes bactériens ont été séquencés par le laboratoire. Parmi ceux-ci, 6 concernent plus particulièrement les thématiques du laboratoire : *Bartonella henselae* MVT01, *Bartonella henselae* MVT02, *Bartonella henselae* MVT03, *Bartonella tribocorum* MVT04 *Bartonella doshiae* MVT05 et *Bartonella schoenbuchensis* MVT07.

F. Plateforme Protéomique (Responsable Eric Chabriere, PU).

Personnels

Saïd AZZA (Ingénieur Recherche, Université), Malgo KOWALCZEWSKA (Ingénieur Etudes, Université), Nicholas ARMSTRONG (IE, AP-HM), Christophe FLAUDROPS (IE, AP-HM).

La Plateforme de Protéomique comporte l'ensemble des équipements nécessaires pour réaliser des gels bidimensionnels y compris en triple marquage, l'équipement nécessaire pour réaliser l'identification des protéines par spectromètre de masse MALDI-TOF ou par Spectromètre de masse à *trappe* d'ions. La plateforme protéomique développe plusieurs types d'approches. Un premier type de projet consiste en l'étude fonctionnelle des protéines par les analyses génomiques. Une deuxième application de cette plateforme est la recherche de protéines antigéniques d'intérêt diagnostique dans la perspective de mise au point de tests sérologiques de troisième génération en forme de test

multiplexé intégrant directement des protéines antigéniques en lieu et place des microorganismes entiers.

Une troisième approche de la plateforme est la protéomique comparative qui permet quant à elle de visualiser et d'identifier les variations d'expression dans un protéome associées à un phénotype du micro-organisme étudié. La technologie 2D-DIGE (2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis) est adoptée pour sa reproductibilité et la fiabilité de ses résultats.

La technologie MALDI-TOF est également utilisée pour les analyses et l'identification de souches bactériennes et peut être appliquée à tout type de bactérie, soit isolée en culture soit dans différents types de prélèvements comme les tiques pour les rickettsies [12]. Cette activité est complètement intégrée à la routine de bactériologie du CNR.

G. Plateforme Bioinformatique (*responsable Pierre-Edouard Fournier, PU-PH*)

Personnels

K. El Karkouri (Ingénieur de Recherche, Université), A. Caputo (Ingénieur d'Etude, AP-HM), F. Armougon (Ingénieur de Recherche, IRD), O. Croce (Ingénieur de Recherche, CNRS), D. Bachar (Ingénieur d'Etude, CNRS), J. Delerce (Ingénieur d'Etude, AP-HM), E. Baptiste (Ingénieur d'Etude, AP-HM)

Depuis juin 2006, l'unité des Rickettsies a constitué une plateforme de bioinformatique, composée de 7 bioinformaticiens ingénieurs de recherche et d'étude. Les activités de ce groupe s'inscrivent autour de 4 axes dont les champs d'applications concernent la structure, l'évolution, la diversité, la pathogénicité et le diagnostic de micro-organismes :

A- Bioanalyse des génomes, métagénomes et diversité : les bioinformaticiens réalisent l'assemblage, l'annotation et l'analyse de données de génomique, métagénomique et diversité (16S) de bactéries et virus (voir publications). Les données sont issues de la plateforme de séquençage de l'unité dotée de pyroséquenceurs Roche GS-FLX+, Illumina Mi-Seq et Ion Torrent.

B- Développement et administration d'outils et de matériel : les bioinformaticiens développent des scripts de structuration et de traitement de données. Ils administrent les clusters et serveurs de calcul et de stockage de données et les banques et données biologiques (NR, COG, RDP-II, RickBase, MST, ...).

C- Services, communication et valorisation : les bioinformaticiens contribuent également à l'accompagnement et à la formation des masters, doctorants et postdoctorants. Ils réalisent la veille technologique, la présentation de résultats aux équipes de l'Unité dans une réunion hebdomadaire de génomique et la valorisation de ces résultats par la participation aux publications (voir publications).

2. 2. Activité de Sérologie

La sérologie est un outil de première intention pour le diagnostic et le suivi thérapeutique des maladies surveillées par le CNR.

A. Immunofluorescence indirecte

La sérologie se fait par immunofluorescence indirecte. Tous les antigènes sont cultivés en laboratoire de niveau de sécurité biologique 3. Les activités de sérologie du CNR ont fait l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2007) sous la référence 8-3446 rév 0.

Pour la fièvre Q, les antigènes de phase II sont obtenus par culture de *Coxiella burnetii* (souche Nine Mile) sur fibroblastes embryonnaires humains de type HEL. Les antigènes de phase I sont obtenus par réactivation du phénotype virulent par passage sur cobaye. La production de ces antigènes est identique aux méthodes précédemment publiées. Les valeurs seuils utilisées pour le diagnostic de fièvre Q aiguë sont $\geq 1:200$ et $\geq 1:50$ pour les IgG et les IgM de phase II, respectivement, et $> 1:800$ pour les IgG de phase I pour le diagnostic de fièvre Q chronique. Ceci permet un suivi sur 25 ans de l'incidence de la fièvre Q.

Pour le diagnostic sérologique des rickettsioses, les rickettsies sont produites sur cellules de rein de singe de type Véro pour les rickettsies du groupe boutonneux, à l'exception de *R. felis* qui est cultivée sur fibroblastes de crapauds de type XTC2, et sur fibroblastes murins de type L929 pour les rickettsies du groupe typhus. La production des antigènes, leur purification et les différentes techniques sérologiques pour le diagnostic des rickettsioses sont identiques aux méthodes publiées. Les valeurs seuils utilisées pour le diagnostic de fièvre boutonneuse méditerranéenne sont $\geq 1:128$ et $\geq 1:64$ pour les IgG et les IgM, respectivement, et $\geq 1:64$ et $\geq 1:32$ pour les IgG et les IgM, respectivement, pour le diagnostic des autres rickettsioses. En raison des réactions croisées entre antigènes, l'immunofluorescence indirecte peut être complétée par une adsorption croisée pour préciser contre quel antigène est dirigée la réponse anticorps.

Pour le diagnostic sérologique des bartonelloses, les *Bartonella* sont produites sur cellules endothéliales humaines de type ECV-304. La production des antigènes, leur purification et les différentes techniques sérologiques pour le diagnostic des rickettsioses sont identiques aux méthodes publiées. La valeur seuil utilisée pour le diagnostic de maladie des griffes du chat est $\geq 1:100$ pour les IgG, et $\geq 1:800$ pour les IgG pour le diagnostic d'endocardite.

Le laboratoire possède une collection importante d'antigènes originaires de tous les continents, ce qui permet d'adapter les pannels d'antigènes à l'épidémiologie des différentes zones d'endémie. Les antigènes testés pour un sérum donné en dépistage varient en fonction du lieu où les patients ont été contaminés. Ainsi, les patients européens sont testés contre *C. burnetii*, *B. henselae*, *B. quintana*, *A. phagocytophilum*, *R. conorii* subsp. *conorii*, *R. slovaca*, *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *R. massiliae*, *R. helvetica*, *R. felis*, et *R. typhi*. Les patients contaminés en Afrique sont testés contre *C. burnetii*, *B. henselae*, *B. quintana*, *R. conorii* subsp. *conorii*, *R. conorii* subsp. *israelensis*, *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *R. aeschlimannii*, *R. felis*, et *R. typhi*. Les patients

contaminés en Asie sont testés contre *C. burnetii*, *B. henselae*, *B. quintana*, *R. conorii* subsp. *indica*, *R. japonica*, *R. honei*, *R. tamurae*, *R. helvetica*, *R. felis*, *R. typhi*, et *Orientia tsutsugamushi* souches Karp, Kawazaki, Kato, et Gilliam. Les patients contaminés en Amérique sont testés contre *C. burnetii*, *B. henselae*, *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *A. phagocytophilum*, *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. africae*, *R. conorii* subsp. *Conorii*, *R. felis*, et *R. typhi*.

Pour chaque échantillon clinique positif, les médecins du CNR prennent contact avec le laboratoire et/ou le clinicien ayant prescrit l'examen pour obtenir des informations épidémiocliniques.

B. Western blot

Pour confirmer le diagnostic de rickettsiose ou d'endocardite à *Bartonella*, le Western blot peut être utilisé et peut permettre soit directement soit après adsorption croisée de préciser l'espèce en cause. Les antigènes sont identiques à ceux utilisés en sérologie par IFI.

2. 3. Activité de Détection Moléculaire

La détection moléculaire des bactéries surveillées par le CNR est un outil de tout premier plan, notamment lorsque des arthropodes, biopsies cutanées, ou échantillons de sang EDTA ont été prélevés et nous ont été adressés. Tous les tests de PCR actuellement utilisés ont été développés au sein du CNR, validés et ont fait l'objet de publications scientifiques internationales. Les gènes ciblés et amorces utilisées sont répertoriés dans le Tableau 1. L'ADN des échantillons est extrait à l'aide de robots EZ1 (QIAGEN, Hilden, Allemagne) et les réactions de PCR réalisées à l'aide de thermocycleurs CFX (BioRad, Berkeley, CA, USA). Pour chaque réaction de PCR, un témoin positif et un témoin négatif sont utilisés. Un circuit de type « marche en avant » dédié (préparation des mix réactionnels → ajout ADN) est utilisé pour limiter les risques de contamination. Depuis 2012, le CNR promeut détection moléculaire par écouvillonnage, qui évite la biopsie cutanée qui était auparavant l'échantillon de référence pour le diagnostic moléculaire et par culture des rickettsioses.

Tableau 1 : Liste des gènes et amorces utilisés par le CNR pour la détection moléculaire des différents microorganismes surveillés

ORGANISMES CIBLES	GENES CIBLES	NOM	SEQUENCES	TAILLE	DILUTION	AMPLICON
BARTONELLA						
Toutes Bartonella	ITS	Barto ITS3 F	GATGCCGGGGAAGGTTTC	19		104 pdb
		Barto ITS3 R	GCCTGGGAGGACTTGAACCT	20		
		Barto ITS3 P	6FAM- GCGCGCCTTGATAAGCGTG	20		
	ITS	Barto ITS2 F2	GGGGCCGTAGCTCAGCTG	18		171 pdb
		Barto ITS2 R2	TGAATATATCTTCTTCCACAATTTC	26		
		Barto ITS2 P	6FAM- CGATCCCGTCCGGCTCCACCA	21		
Bartonella henselae	PAP	PAP 246F	TATGCCTTATGTTGCTGGTGGT	22		151 pdb
		PAP 396R	ACCACCGCCAAGAGTGAAAC	20		
	PAP246/396_MBP	6FAM- CAAGCAGCAGATGATGCAGAAATCGC	26			
	PAP 246F/396R ancienne son	6FAM- CTGTGAGTCTACTAAGGTAA				
	GROEL	GROEL 493F	GGTGTGGACAAAAGAGCGA	20		151 pdb
		GROEL 643R	TTGCTCCACCAACACGGATA	20		
		GROEL P 493F/643R	6FAM- AATTGCAAGAAAGACTTGCT	20		
Bartonella quintana	yopP	B qui 11580F	TAAACCTCGGGGAAGCAGA	20		134 pdb
		B qui 11580R	TTTCGTCTCAACCCCATCA	20		
		B qui 11580P	6FAM- CGTTGCCGACAAGACGTCCTTGC	23		
	fabF3	B qui 05300F	GCTGGCCTTGCTCTTGATGA	20		139 pdb
		B qui 05300R	GCTACTCTGCTGCTTGGA	20		
B qui 05300P		6FAM- TGCAGCAGTTGGAGGAGAACGTG	23			
COXIELLA						
Coxiella burnetii	hypothetical p.	IS30a 3F	CGCTGACCTACAGAAATATGTCC	23		164 pdb
		IS30a 3R	GGGGTAAAGTAAATAATCCTTCTGG	25		
		IS30a F3-R3 P	6FAM- CATGAAGCGATTTATCAATACGTGTATGC	29		
	IS1111A confirmation	IS 1111 0706 F	CAAGAAACGTATCGCTGTGGC	21		154 pdb
		IS 1111 0706 R	CACAGAGCCACCGTATGAATC	21		
		IS1111 07-06 P	6FAM- CCGAGTTCGAAACAATGAGGGCTG	24		
EHRLICHIA						
Anaplasma phagocytophilum	polA	A_pha0001F	TTTGATTCGGGGTCGAAAAA	20		121 pdb
		A_pha0001R	AACGCTTCAACAGCCTCACG	20		
		A_pha0001P	6FAM- TCGCCCTAAAGCACCAGAGGATCTG	25		
	gatA	A_pha0748F	CGCACTACCGCATGCTCTG	19		129 pdb
		A_pha0748R	AGCCATGGCAAATTCATCC	20		
		A_pha0748P	6FAM- TGTTGATGATGGGAAATTGAACA	26		
	orf 1395	A_pha1395F	CAGAAGAAACCGCAGGGGATA	20		138 pdb
		A_pha1395R	TCGACGTAGGTGAGCTGCAA	20		
		A_pha1395P	6FAM- TGACCAAAGATGCACATGGTGACACA	25		
Ehrlichia canis	taredoxin related	E_can0701F	TGAGGCCATTAAAGAAATTCACAA	23		113 pdb
		E_can0701R	TGAAGCTCTCCACTGTGGTACATTT	25		
		E_can0701P	6FAM- AGGTGAGTTTATTGGGTGCGACA	23		
	hyp. p.	E_can0503F	CAGCAAATCCAATTCGCACTTC	23		146 pdb
		E_can0503R	GAGCTTCCAATTGATGGGTCTG	22		
		E_can0503P	6FAM- TGTTATCTAATGCAAAAATCCCGGCA	27		
Neorickettsia sennetsu	gltA	gltA sennetsu F	GGCTACAGCTAGTTTATGGGG	21		166 pdb
		gltA sennetsu R	AGTTTTTATACACCTGTGCC	22		
		gltA sennetsu	6FAM- GCGGTTAAAAGAAAAGAAGAGAGAC	26		

2.4. Activité de Culture

Tous les échantillons reçus par le CNR pour culture (tout type de biopsie, arthropodes, sang hépariné, pourvu qu'ils aient été préservés à -80°C après prélèvement et envoyés en carboglace) sont transférés dans le laboratoire NSB3. Cinq techniciens sont chargés de traiter ces échantillons sous hotte NSB3 : chaque échantillon est partagé en plusieurs aliquots dont un pour la culture, un pour la détection moléculaire et un qui sera conservé à -80°C pour d'éventuelles analyses ultérieures. Toutes les cultures sont réalisées en tube bijou. Cette méthode de culture, dans laquelle un tapis de cellules cultivées sur lamelle est placé au fond du tube, met en jeu une étape de centrifugation des prélèvements pour augmenter le ratio bactéries/cellules. Les cellules les plus utilisées en première intention sont les cellules endothéliales.

2.5 Souchier de microorganismes fastidieux

L'Unité des Rickettsies, par sa spécificité de Centre National de Référence pour l'étude des rickettsies, a acquis une expérience unique dans la culture des bactéries de culture difficile, qu'elles soient intra- ou extra-cellulaires. La collection unique de souches bactériennes constituée par l'Unité des Rickettsies est riche de plus de mille souches de bactéries intra-cellulaires. Un technicien, Mr Jérôme Terras, est directement responsable de l'entretien du souchier, sous la responsabilité du Pr Fournier. Les moyens auxquels le laboratoire a accès pour cultiver les souches bactériennes sont les deux laboratoires de niveau de sécurité biologique 3. Le Pr Fournier est habilité à la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous la référence ADE-021722012-9).

A. Protocoles de conservation

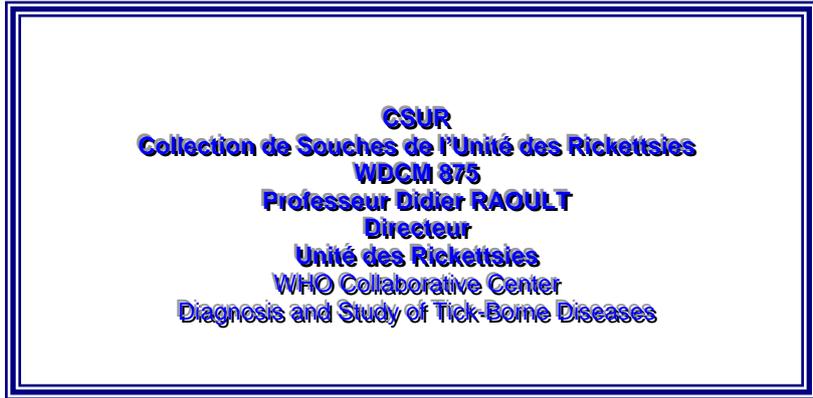
Les souches cultivées en laboratoire NSB3 sont conservées selon trois modes de conservation : congélateurs à -80°C, azote liquide et lyophilisation dans des locaux sécurisés (froid et accès). Ces souches sont organisées au sein de la Collection de souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR). Ces souches sont référencées dans un ordinateur lui aussi sécurisé dans lequel sont entrés aussi les références de typage de ces souches quand elles existent.

B. La collection CSUR

L'Unité des Rickettsies, Centre National de Référence des Rickettsioses a décrit 10 des 26 espèces validées de *Rickettsia*. La description de nouvelles espèces de *Rickettsia* obéit aux nouvelles règles développées par le Comité International de Systématique des Procaryotes pour l'ensemble des bactéries, dont la mise à disposition des souches-type pour les scientifiques qui souhaitent les étudier. Les souches du CNR sont déposées dans la Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR, WDCM 875) dont le curateur est le Pr Fournier (<http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=14&titre=collection-de-souches>). La CSUR est l'une des rares collections dans le monde avec l'American Type Culture Collection qui accepte les bactéries intracellulaires strictes. Actuellement, **215 souches de *Rickettsia*, 295 souches de *Coxiella burnetii* et 662 souches de *Bartonella*** sont déposées dans la CSUR (Tableau 2), faisant de cette collection **la plus grande collection mondiale de bactéries intracellulaires strictes ou facultatives**. En effet, le total des souches de *Bartonella* et *Rickettsia* des collections ATCC, CIP, CCUG et DSMZ cumulées n'atteint pas 100 souches. Conformément à la législation sur la circulation des souches bactériennes, la CSUR ne distribue pas les souches de *Coxiella burnetii*, *Rickettsia prowazekii*, et *Rickettsia rickettsii*. La liste exhaustive des souches de *Rickettsia*, *Bartonella* et *Coxiella* disponibles à la CSUR est disponible online (<http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=349&titre=centre-national-de-reference-des-rickettsia-coxiella-et-bartonella>). Les souches peuvent être déposées ou demandées à la CSUR à l'aide du formulaire ci-dessous.

Tableau 2. Nombre de souches par espèce dans la collection de souches

Genres	Espèces	Nombre de souches
<u>Bartonella</u>	<i>Alsatica</i>	1
	<i>Australis</i>	10
	<i>Bacilliformis</i>	1
	<i>Birtlesii</i>	5
	<i>Bovis</i>	34
	<i>Capreoli</i>	1
	<i>Chomelii</i>	1
	<i>Clarridgeiae</i>	27
	<i>coopersplainensis</i>	1
	<i>Doshiae</i>	1
	<i>Elizabethae</i>	1
	<i>Florentiae</i>	2
	<i>Grahamii</i>	1
	<i>Henselae</i>	91
	<i>Koehlerae</i>	2
	<i>Massiliensis</i>	2
	<i>Phoceensis</i>	1
	<i>Queenslandensis</i>	5
	<i>Quintana</i>	430
	<i>Rattaaustraliani</i>	5
	<i>Rattimassiliensis</i>	9
	<i>Senegalensis</i>	3
	<i>Schoenbuchensis</i>	17
	<i>Taylorii</i>	1
	<i>Tribocorum</i>	23
	<i>Vinsonii</i>	3
	<i>Weissi</i>	4
	<u>Coxiella</u>	<i>Burnetii</i>
<u>Rickettsia</u>	<i>Aeschlimannii</i>	7
	<i>Africae</i>	34
	<i>Akari</i>	1
	<i>Amblyommii</i>	1
	<i>Argasii</i>	1
	<i>Asiatica</i>	5
	<i>Australis</i>	1
	<i>Bellii</i>	1
	<i>Canadensis</i>	1
	<i>Conorii</i>	85
	<i>Felis</i>	3
	<i>Gravesii</i>	1
	<i>heilongjiangensis</i>	2
	<i>Helvetica</i>	4
	<i>Honei</i>	2
	<i>Japonica</i>	3
	<i>Massiliae</i>	7
	<i>Montanensis</i>	1
	<i>Parkeri</i>	2
	<i>Raoultii</i>	7
	<i>Rhipicephali</i>	1
	<i>Sibirica</i>	15
	<i>Slovaca</i>	22
	<i>sp.</i>	2
	<i>Tamurae</i>	1
	<i>Typhi</i>	1
	<u>Orientia</u>	<i>Tsutsugamushi</i>



STRAIN ORDER FORM

CSUR Account Number: *

Organization: *

First Name: *

Last Name: *

Phone: * (example: 33 (0)491 385517)

Fax:

E-mail: *

Street: *

City: *

Post Code: * (required)

Country:

	CSUR ref	Product Description	Unit Price in EUR	Quantity	Price in EUR
ex	R1	Rickettsia tamurae strain AT-1	750.00	<input type="text"/>	750.00
1			750.00	<input type="text"/>	
2			750.00	<input type="text"/>	
Total:					<input type="text"/>

Please fax (33 (0)491 38 77 72) or email the order form (didier.raoult@gmail.com)

Faculté de Médecine - 27, bvd Jean MOULIN - 13385 MARSEILLE Cédex 5 -FRANCE
 Tél :33 (0)491 32 43 75, Telefax : 33 (0)491 38 77 72, e-mail: Didier.Raoult @ medecine.univ-mrs.fr



STRAIN DEPOSIT FORM

To be completed by the strain's contributor or contributor's authorized representative. Please print or type.

Agent: _____ Strain: _____
 Taxonomic classification : _____

1. Background information

- a. This strain was isolated by: _____
- b. From (host): _____ Organ: _____
 Tissue: _____ Fluid: _____
- Was this strain obtained from human subjects? Yes No
- c. Clinical disease or symptoms exhibited by host: _____
- d. Reference. *Please enclose a copy of relevant references.*
- e. Officially recognized as reference strain by (committee): _____
- f. List any special handling requirements: _____
- g. Recommended storage conditions (temp, etc.): _____
- h. Recommended method for rapid identification (*i.e.*, antibody and source): _____
- i. Host range: _____ Incubation: _____
 Circle host of choice for *in vitro* propagation _____ days/temp
- j. Effect (type of CPE, etc.): _____
- k. Special characteristics (physical properties, stability, cross reactions, hemolysin production, presence or absence of mycoplasma, sequence information, etc.): _____
- l. If you did not isolate this strain, indicate from whom you received it: _____

2. Reason for deposit (new taxon, attenuated strain, utility as a vector, etc.): _____

3. Properties of material

- a. Propagated in (host cells, animal or tissue): _____
- b. Medium used, etc.: _____
- c. Titer (list as units/volume, *i.e.*, PFU/ml): _____ Titer date: _____
- d. Titer conditions (host system, route of inoculum, days to final reading): _____
- e. Final preparation (proportion of suspending medium, cryoprotectants, antibiotics, etc.): _____
- f. Passage level (full passage history of material deposited): _____

4. Safety information

a. Is the strain hazardous for humans? _____ Animals? _____ Plants? _____

If yes, what is the recommended Biosafety level for working with this culture? (refer online to www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4toc.htm): _____

b. Does this agent require any special permits? Yes No If yes, please specify? _____

c. List any routine vaccinations or surveillance provided to investigators handling this agent: _____

5. Legal status of deposit: check either **a** or **b** to determine the conditions under which the culture is deposited at CSUR (**either a or b MUST BE CHECKED**):

a) This is a bailment deposit. The contributor designated below understands that this material is for deposit in the CSUR general collection. It will be examined, and if accepted by the CSUR, batches will be made and distributed to the scientific community for a fee to cover expenses.

b) This is a deed-of gift deposit. The contributor designated below hereby gives CSUR ownership of the transferred quantity of material, with the authority to reproduce, use, give, sell, or otherwise transfer the material to third parties who also may reproduce, use, and further transfer the material, as permitted by CSUR.

Gift on behalf of the following donor: _____

6. CSUR may, in accordance with its then current procedures and resources, authenticate (if appropriate) and preserve the material.

7. This form states the entire agreement between the parties regarding the material. The undersigned are authorized to execute this agreement.

Contributor

*Duly Authorized for Contributor's Institution
(if required by Contributor's Institution)*

Signature Date

Signature Date

Printed Name and Title

Printed Name and Title

Institution

Institution

Mailing Address

Mailing Address

Telephone

Telephone

Fax

Fax

Email

Email

Please fax (33 (0)491 38 77 72) or email the order form (didier.raoult@gmail.com)

2.6 Réseaux de partenaires

Le CNR a de nombreux partenaires aussi bien en France qu'à l'étranger. La liste des partenariats et correspondants étrangers figure plus loin dans ce rapport. Sur le plan national, il n'existe pas de partenariat institutionnalisé mais le CNR collabore de façon durable avec des laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire. Le CNR fournit notamment des antigènes et des sérums contrôlés positifs aux Laboratoires des CHU de Bordeaux (Pr. BEBEAR), Paris (Pr. MAINARDI), Strasbourg (Pr. JAULHAC), Tours (Pr. GOUDEAU) et du CHG d'Aix en Provence (Dr. CHARDON) ainsi qu'à l'étranger (Russie, Slovaquie, Espagne, Suisse, Taiwan...).

Le CNR collabore avec l'ECDC au travers de la fourniture annuelle des données épidémiologiques sur la fièvre Q.

Centre de référence	Année de création
Centre de Référence pour l'étude et le diagnostic des Rickettsioses, Bartonelloses, Fièvre Q et maladies transmises par les tiques	1985
Centre de référence BIOTOX pour la zone de défense Sud	2001
Centre collaborateur Orphanet et Centre de Référence de la Maladie de Whipple	2001
Centre de Ressources et de Compétences pour la mucoviscidose	2006
Centre Collaborateur OMS de référence et de recherche pour les rickettsioses	1998 - 2002
Centre Collaborateur OMS de référence et de recherche pour les rickettsioses et autres bactéries transmises par les arthropodes	2002-2014
Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies	2004

2.7 Coopérations institutionnelles

Le Groupe Européen d'Etudes sur Rickettsia, Ehrlichia et Coxiella (ESCAR), devenu en 2015 ESCCAR (European Society for Chlamydioses, Coxiellosis, Anaplasmosis, Rickettsioses and other arthropod-borne intracellular bacteria) réunit les trois Centres Collaborateurs OMS Européens (Marseille, Moscou, Bratislava). Le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER est président élu de l'ESCAR depuis 2015.

Centres collaborateurs OMS sur les rickettsioses

- Gamaleya Institute (Russie)
- Slovak Academy of Science (Slovaquie)
- Center for Diseases Controls (Atlanta – USA)
- Center for Tropical Diseases (Galveston, USA)
- Center for Tropical Diseases (Heraklion, Grèce)

Collaborations internationales autres

De nombreux échanges de chercheurs ont été réalisés. Des coopérations spécifiques dans le domaine du diagnostic des nouvelles maladies infectieuses ont été conduites avec les institutions suivantes :

- Shangai II
- Université de Pékin
- SPS (Japon)
- OMSK Scientific Research Institute of Natural Foci Infections (Omsk, Russie)
- Hôpital de Tunis (Tunisie)
- Université de Sfax (Tunisie)
- Université de Sousse (Tunisie)
- Hôpital de Batna (Algérie)
- Hôpital de Bamako (Mali)
- Hôpital Principal de Dakar (Sénégal)
- Welcome trust d'Oxford (Grande-Bretagne, Thaïlande) et Hôpital de Ventiane (Laos)
- Université de Lausanne (Suisse)
- Université de Palerme (Italie)
- Hôpital de Tamilnadu (Inde)
- Hôpital de Bangkok (Thaïlande)
- Institut Pasteur Alger (Algérie)
- Institut Pasteur Casablanca (Maroc)
- Université d'Edirne (Turquie)
- Institut Vétérinaire de Palmerston (Nouvelle-Zelande)
- Hôpital d'Oslo (Norvège)

Programmes européens

- Réseau sur les maladies transmises par les vecteurs VBORNET
- Laboratoire de référence : contrôle externe
- Suède : S. Vene – Stockholm
- Suisse : A. Dumoulin – Sion
- USA : C. Paddock – CDC

2.8 Collaborations avec les pays étrangers

Liste des collaborateurs étrangers du CNR

Pays	Correspondant	Ville
Europe		
Belgique	Dr Monny Hing	Bruxelles
Espagne	Pr Jose Oteo	Logrono
Grande Bretagne	Pr Richard Birtles	Manchester
Grèce	Pr Yannis Tselentis	Heraklion

	Pr Achilleas Gikas	Heraklion
Italie	Dr Laura Franzin	Turin
Norvège	Pr Mogens Jensenius	Oslo
Portugal	Dr Anna Santos	Lisbonne
Russie	Pr Stanislav Shpynov	Moscou, Omsk
Slovaquie	Dr Zuzana Sekeyova	Bratislava
Suisse	Pr Gilbert Greub	Lausanne
	Dr Alexis Dumoulin	Sion

Maghreb

Algérie	Dr Idir Bitam	Alger
	Dr Kheira Mokrani	Batna
Maroc	Dr Nadia Boudebouch	Casablanca
Tunisie	Pr Amel Letaief	Sousse
	Dr Abir Znazen	Sfax

Asie

Japon	Pr Hisachi Inokuma	Obihiro
Laos	Pr Paul Newton	Vientiane
Thaïlande	Dr Yupin Supputamongkol	Bangkok
	Pr George Watt	Bangkok

Océanie

Australie	Pr Stephen Graves	Victoria
Polynésie française	Dr Didier Musso	Papeete

Amériques

Canada	Pr Thomas J. Marrie	Edmonton
Saint Kitts/Nevis	Pr Patrick Kelly	Basseterre
USA	Dr Christopher Paddock	Atlanta
	Dr Gregory Dasch	Atlanta

3 – ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

En 2015, les données concernant les microorganismes et les infections dépendant du CNR ont été collectées de façon continue et régulièrement analysées, ce qui permet la détection de l'émergence de nouveaux phénomènes comme des nouveaux microorganismes ou des épidémies.

3.1. Réseau de partenaires

3.1.1 Collaborations avec l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est partenaire du laboratoire d'études et de recherches sur la pathologie des petits ruminants et des abeilles, dépendant de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Ce laboratoire, situé à Sophia-Antipolis, est laboratoire national de référence (LNR) pour la fièvre Q en santé animale depuis décembre 2009. A ce titre et dans le cadre d'un groupe de travail avec la direction générale de l'alimentation (DGAL), il participe à la mise en place un réseau pilote des laboratoires départementaux d'analyse chargés du diagnostic de cette pathologie.

Il fournit un appui scientifique et technique aux services vétérinaires de l'Etat : analyse de prélèvements en seconde intention, contrôle de vaccins, fourniture de réactifs de référence, suivi de la qualité des analyses des laboratoires de terrain (au travers d'essais inter-laboratoires notamment), expertise d'outils de diagnostic du commerce et mène des recherches portant sur l'harmonisation des outils pour le diagnostic et l'épidémiologie. Il s'est investi dans plusieurs études sur la vaccination en tant qu'outil de la gestion en élevage.

Le CNR et le LNR ont débuté en 2016 une collaboration scientifique sur l'étude génomique comparée des souches humaines et animales de *Coxiella burnetii*, matérialisée par l'embauche d'un étudiant post-doctorant commun.

3.1.2. Collaborations avec l'ECDC

Le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est partenaire du **réseau EuroTravNet** depuis 2009 (www.eurotravnet.fr). EuroTravNet est un réseau de cliniciens européens spécialistes en médecine des voyages et en maladies tropicales. Ce réseau est le référent du **CDC Européen** (www.ecdc.europa.eu), qui le finance depuis 2009. Le Pr Parola dirige le centre coordinateur d'EuroTravNet. Le but d'EuroTravNet est d'aider l'ECDC dans ses missions de détection des maladies infectieuses importées en Europe, et dans l'apport d'une expertise sur les maladies transmissibles. EuroTravNet a récemment proposé à tous les membres du réseau (40 centres dans 20 pays en Europe) une surveillance des rickettsioses européennes avec la proposition d'analyser les échantillons au CNR de Marseille. La base du réseau est constituée par les sites européens du **réseau Geosentinel** (www.geosentinel.org).

3.1.3. European Society for Coxiellosis, Chlamydioses, Anaplasmosis and Rickettsioses (ESCCAR)

Le CNR collabore étroitement avec l'ESCCAR depuis sa création par le Pr Raoult, 1^{er} Président de l'ESCAR. Actuellement, le Pr Fournier est président de l'ESCCAR.

3.2. Facturation des analyses réalisées par le CNR des Rickettsies, Coxiella et Bartonella

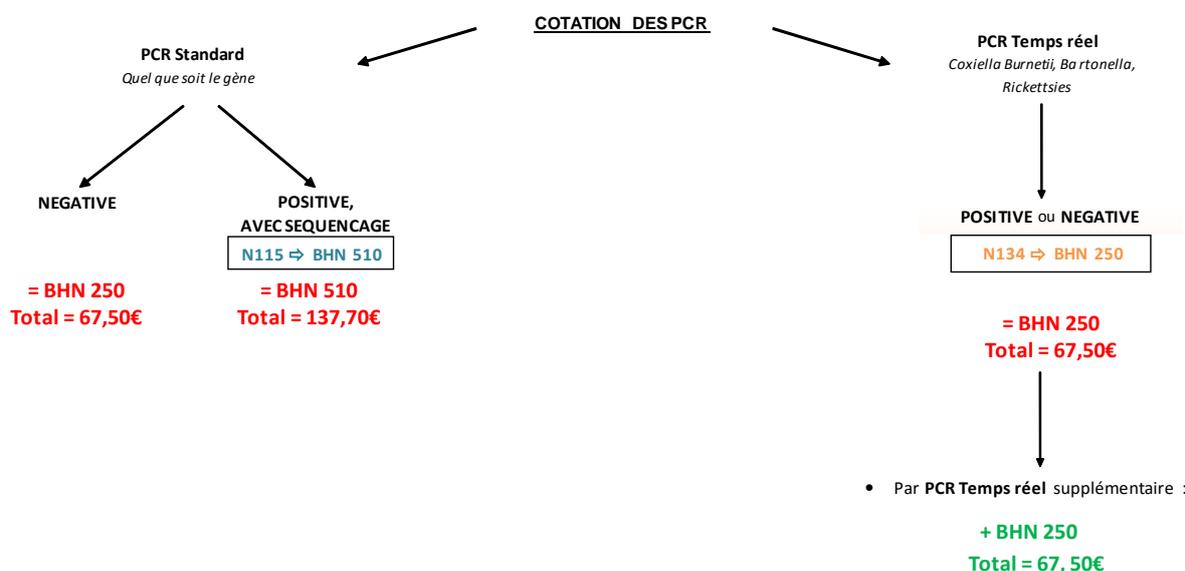
Le CNR réalise des analyses par « syndrome », en testant pour un échantillon clinique donné les agents microbiens potentiellement en cause compte tenu des critères épidémiocliniques présentés par le patient. Cependant, le CNR ne facture, que les analyses spécifiées par les prescripteurs, quel que soit le nombre d'examen réalisés, selon la nomenclature ci-dessous.

FIEVRE Q (<i>Coxiella burnetii</i>)				
DEPISTAGE	TITRATION	COTATION	CODES NOMENCLATURES	TARIF
NEGATIF	-	BHN 40	G238	10€80
POSITIF <i>Phase 1 et/ou Phase 2</i>	Sans variation	BHN 100 (BHN40+BHN60)	G237+G238	27€
	Avec variation	BHN130 (BHN40+BHN90)	G237+G239	35€10

RICKETTSIOSES (<i>R. conorii</i> + <i>R. typhi</i>)				
DEPISTAGE	TITRATION	COTATION	CODES NOMENCLATURES	TARIF
NEGATIF	-	BHN 40	G238	10€80
POSITIF	Sans variation	BHN 100 (BHN40+BHN60)	G237+G238	27€
	Avec variation	BHN130 (BHN40+BHN90)	G237+G239	35€10

BARTONELLOSES (<i>B. quintana</i> et <i>B. henselae</i>)				
DEPISTAGE	TITRATION	COTATION	CODES NOMENCLATURES	TARIF
NEGATIF	-	BHN 40	G238	10€80
POSITIF	Sans variation	BHN 100 (BHN40+BHN60)	G237+G238	27€
	Avec variation	BHN130 (BHN40+BHN90)	G237+G239	35€10

EHRLICHIOSE (Anaplasmosse)				
DEPISTAGE	TITRATION	COTATION	CODES NOMENCLATURES	TARIF
NEGATIF	-	BHN 40	G238	10€80
POSITIF	Sans variation	BHN 100 (BHN40+BHN60)	G237+G238	27€
	Avec variation	BHN130 (BHN40+BHN90)	G237+G239	35€10



3.3. Surveillance des rickettsioses, de la fièvre Q et des bartonelloses

Origine des prélèvements

Le CNR reçoit et analyse des échantillons cliniques en provenance des centres hospitaliers régionaux et généraux, des Hôpitaux d'instruction des armées, des hôpitaux et cliniques privés, de l'institut Pasteur (Paris, Lille, Cayenne) et de nombreux laboratoires d'analyses de biologie médicale et/ou de microbiologie en France et à l'étranger.

3.3.1 Diagnostic de la fièvre Q

En 2015, 14278 échantillons de serum provenant de 11359 patients ont été testés au CNR pour présence d'anticorps contre *C. burnetii* contre 14872 prélèvements de 11455 patients en 2014 (-4%). De plus, nous avons reçu 6659 échantillons divers (sang, biopsies ganglionnaires, valves cardiaques, biopsies vasculaires, LCR notamment) de 4319 patients (contre 5 218 échantillons de 4052 patients en 2014, +28%) pour diagnostic moléculaire et culture.

A. Diagnostic sérologique

Au total, 1202 (594 patients) se sont révélés positifs en IgG ($\geq 1 :100$) et/ou IgM ($\geq 1 :50$). **Deux cent dix-huit** nouveaux cas de fièvre Q aiguë ont été diagnostiqués en 2015 contre **209** (+4%) en 2014 et **51** nouveaux cas de fièvre Q chronique contre **43** (+19%) en 2014. Enfin, **325** patients présentaient un profil de fièvre Q ancienne ou chronique diagnostiquée avant 2015 et en cours de traitement.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Trois-cent-huit prélèvements (4.6%) provenant de **72** patients ont fait l'objet d'une détection de *C. burnetii* positive par détection moléculaire.

C. Diagnostic par culture

En outre, 12 souches de *Coxiella burnetii* ont été isolées en culture cellulaire de biopsies de valves cardiaques (6), d'anévrismes de l'aorte (3) et de sang (3) (cf Tableau sur le site Web du CNR).

C. Fièvres Q aiguës

Le nombre de patients atteints de fièvre Q aiguë en 2015 et pour lesquels le CNR a reçu des prélèvements était de **218** ce qui représente une incidence de **0,33** pour 100.000 personnes en France (métropole et départements d'Outre Mer), stable par rapport à 2014 (0.32%). Bien sur, ces chiffres d'incidence sous-estiment l'incidence de la maladie en France puisque elle n'est pas à déclaration obligatoire. Aucune épidémie de fièvre Q n'a été décelée en 2015 en France. Parmi les 218 patients atteints de fièvre Q aiguë, **159 (72.9%)** étaient de sexe masculin (sex ratio M/F 2.69). L'âge moyen des patients atteints de fièvre Q était de **56 +/- 16** ans. Le plus jeune patient atteint de fièvre Q aiguë avait 5 ans et le plus âgé 91 ans. **Cent cinquante-trois** des 218 patients atteints de fièvre Q présentaient une hépatite fébrile (70,2%), **59** une pneumonie (27.1%), **4** une infection ostéo-articulaire (1,8%) (Tableau 3). Un patient âgé de 56 ans présentait des adénopathies multiples et une sérologie positive évocatrice de fièvre Q aiguë a été obtenue chez une patiente de 38 ans asymptomatique.

Tableau 3 : Données démographiques des patients atteints de fièvre Q aigüe

Forme clinique	Hépatite	Pneumonie	Infection ostéo-articulaire
Age moyen +/- écart-type	57 +/- 15,4	55 +/- 18,3	68 +/- 9,6
Sex-ratio H/F	2,4	3,5	4/0

La répartition temporelle des cas métropolitains de fièvre Q aigüe en fonction du mois du diagnostic pour 2015 montre deux pics en février (14,1%) et un pic en juin-juillet (39,4%) (Figure 3). Il est à noter que cette répartition en deux pics est similaire à celles observées en 2013 et 2014. La répartition géographique des cas métropolitains de fièvre Q en 2015 est présentée dans la Figure 4. La majorité des nouveaux cas de fièvre Q aigüe (40,1%) a été diagnostiquée dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA), suivie par les régions Poitou-Charentes (13,4%), Rhône-Alpes (9,3%), Centre (8,7%), Midi-Pyrénées (8,2%), et Aquitaine (7,5%). Cent quarante-quatre des patients ayant contracté la fièvre Q en métropole présentaient une hépatite (84,7%), 24 une forme pulmonaire (14,1%), 4 une infection ostéo-articulaire (2,3%) et 1 patiente était asymptomatique.

Outre-mer, la Guyane est la région française où la fièvre Q a la plus forte incidence (Figure 5), avec **43** nouveaux cas de fièvre Q aigüe diagnostiqués en 2015, soit une incidence pour 100.000 habitants de 17,2, en réascension par rapport à l'année 2014 qui constituait la troisième année consécutive de baisse (17,8 en 2012, 16,8 en 2013, 13,2 en 2014). Clairement, la fièvre Q en Guyane diffère par sa présentation clinique de la métropole, avec une majorité de pneumonies (35 patients, 81,4%) et moins d'hépatites (8 patients, 18,6%). Cette différence est statistiquement significative ($p < 10^{-2}$).

Enfin, le CNR a diagnostiqué un cas de fièvre Q aigüe à la Réunion, 2 en Israël et un en Italie.

Figure 3. Répartition annuelle des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués par le CNR en 2015 en France métropolitaine

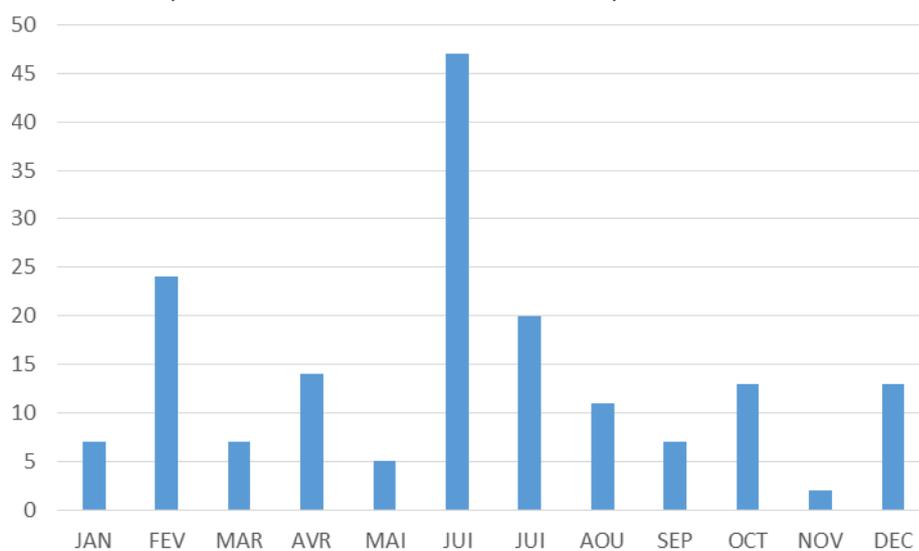


Figure 4. Répartition géographique des cas métropolitains de fièvre Q diagnostiqués par le CNR en France métropolitaine en 2015

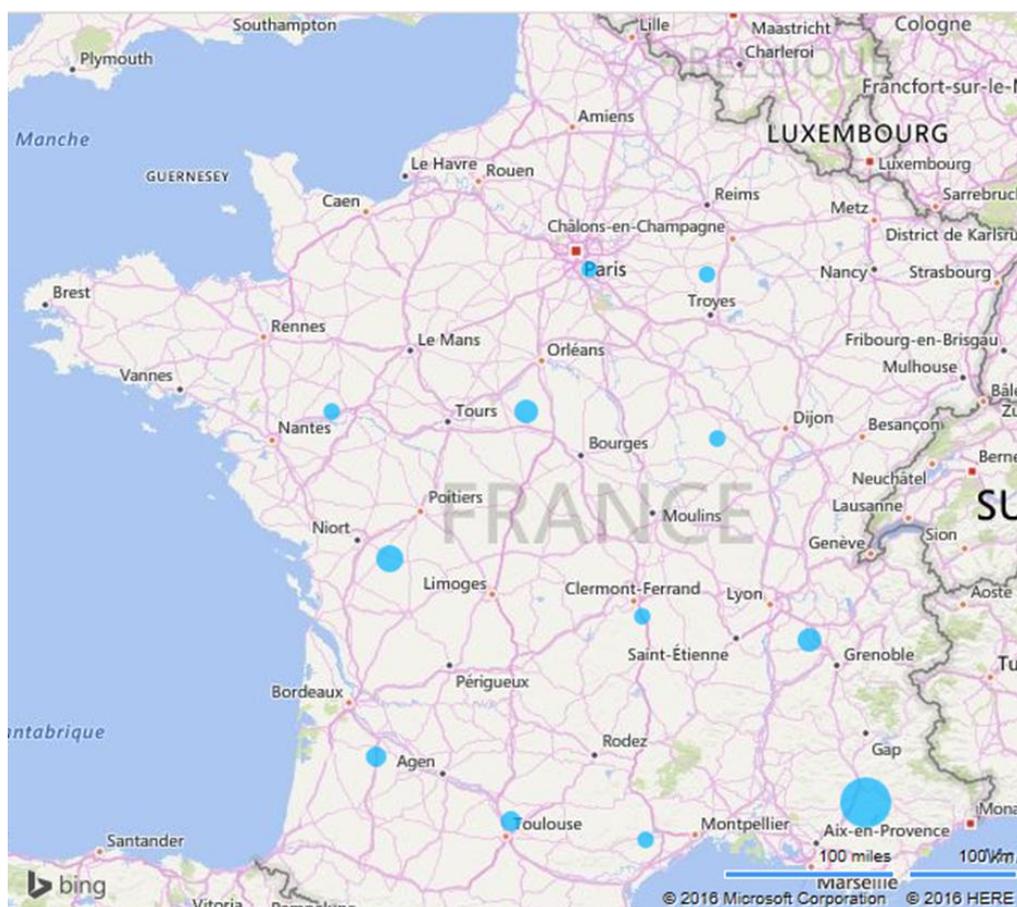
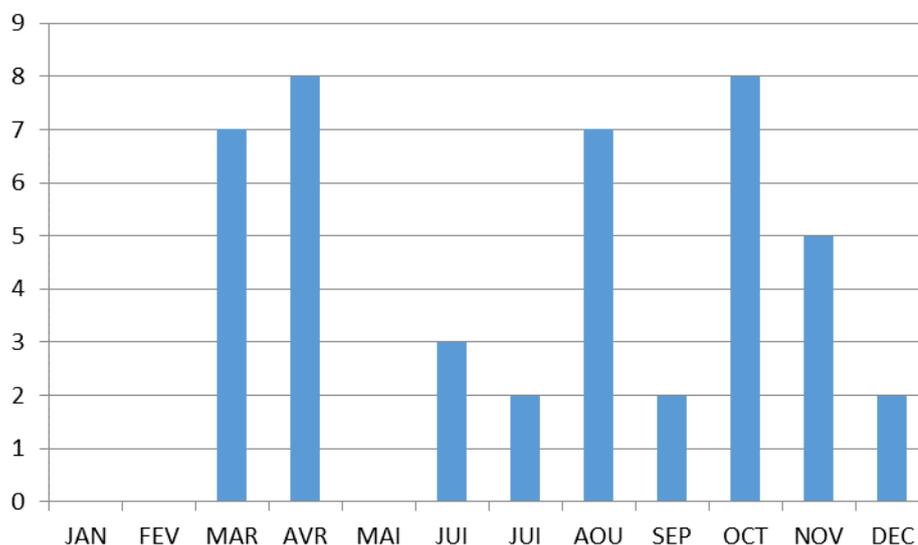


Figure 5. Répartition annuelle des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués par le CNR en 2015 en Guyane française



D. Formes focales d'infections à *C. burnetii*

Cinquante-et-un nouveaux cas d'infection focale à *C. burnetii* (fièvre Q chronique) ont été diagnostiqués par le CNR en 2015 contre **43** en 2013 (+19%). Parmi ces patients, le sex ratio H/F était de 5,37 (43/8). L'âge moyen de l'ensemble des patients était de 62 +/- 17 ans. Les infections focales à *C. burnetii* se répartissaient selon les formes suivantes : endocardites (N = 40, 78,4%) et infections vasculaires (N = 11, 21,6%). Les patients atteints d'infections vasculaires étaient tous de sexe masculin et étaient plus âgés que ceux présentant une endocardite (65 +/- 9 ans vs 61 +/- 19 ans). Concernant l'origine des patients présentant une forme chronique de fièvre Q, la région PACA est première (8 endocardites et 3 infections vasculaires), suivie de Midi-Pyrénées (5 EI et 1 IV), Rhône-Alpes (5 EI) et Aquitaine (3 EI et 2 IV). En dehors de la France métropolitaine, 3 endocardites ont été diagnostiquées chez des patients de Guyane française et 1 à la Réunion, 2 endocardites en Israël, 1 en Grande-Bretagne et 1 aux Pays-Bas, et une infection vasculaire en Italie. **Aucune saisonnalité** n'a été notée en ce qui concerne le mois de diagnostic des nouveaux cas de fièvre Q chronique en France métropolitaine.

3.3.2 Diagnostic des Rickettsioses

En 2015, **63 cas de rickettsioses** ont été diagnostiqués au CNR contre **52 en 2014** (+21%).

A. Diagnostic sérologique

Parmi les **11359** patients testés, un diagnostic de rickettsiose a été porté chez **63** patients (Figure 7). Ces diagnostics incluent les diagnostics suivants : **17 cas d'African tick-bite fever** (ATBF, *R. africae*), **12 cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne** (FBM, *R. conorii*), **12 cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite** (SENLAT, 11 causés par *R. slovaca* et 1 par *R. raoultii*), **11 cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis** (LAR, *R. sibirica* sous-espèce *mongolitimoniae*), **5 cas de typhus murin** (TM, *R. typhi*), **4 cas de typhus des broussailles** (TB, *O. tsutsugamushi*) et **2 cas de fièvre boutonneuse à puce** (FB, *R. felis*). Les caractéristiques des patients infectés par type d'infection ainsi que le lieu géographique de la piqure lorsqu'il était connu figurent dans le Tableau 5. La distribution temporelle des cas de rickettsioses est montrée dans la figure 7.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Mille cent quatre-vingt-dix-huit prélèvements de 849 patients ont fait l'objet d'un diagnostic par biologie moléculaire. Soixante-cinq (5,4%) de ces prélèvements se sont révélés positifs et ont permis de contribuer au diagnostic de rickettsioses pour 49 des 63 patients positifs. La nature des prélèvements les plus fréquemment positifs étaient les biopsies cutanées (27%) et les écouvillons d'escarre (27%). En outre, 6 tiques prélevées sur 6 patients se sont révélées positives. *Rickettsia africae* (N = 16) était l'espèce de rickettsie la plus fréquemment diagnostiquée par biologie moléculaire, suivie par *R. slovaca* (N = 11), *R. sibirica* sous-espèce *mongolitimoniae* (N = 11), *R. conorii* (N = 7), *Orientia tsutsugamushi* (N = 3) et *R. raoultii* (N = 1).

C. Diagnostic par culture

En outre, 7 souches de rickettsies ont été isolées en culture cellulaire de biopsies cutanées ou de tiques, incluant 3 souches de *R. slovaca*, 2 souches de *R. africae*, 1 souche de *R. conorii* et 1 souche de *R. sibirica* sous-espèce *mongolitimoniae* (cf Tableau sur le site Web du CNR).

D. Répartition des cas de rickettsioses diagnostiqués

Les cas de FBM sont survenus en majorité en été dans le pourtour méditerranéen (Figure 6, Tableau 4), qui est la zone d'endémie de cette rickettsiose associée à la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus*. Cependant, un cas a été diagnostiqué en décembre chez un patient de retour d'Algérie. Ses 17 cas d'ATBF, 16 ont été contractés à l'occasion de visites de parcs animaliers d'Afrique du sud ou du Zimbabwe, où la maladie est endémique et transmise par les tiques du genre *Amblyomma*. Le dernier cas a été contracté après piqûre de tique en Grèce. Un des cas de typhus

murin a été contracté dans l'île de la Réunion où la maladie est présente depuis plusieurs années. Les autres cas ont été contractés en Asie (Vietnam) et aux USA (Californie). Les cas de fièvre boutonneuse à puce ont été contractés dans les Bouches du Rhône et l'Hérault, respectivement. Les cas de SENLAT ont été contractés dans les départements suivants : Bouches du Rhône, Hérault, Loiret, Puy-de-Dôme, Pyrénées-Atlantiques et Vendée, majoritairement de février à juin. Les cas d'infection à *R. sibirica* sous-espèce *mongolitimonae* ont été contractés dans les Bouches du Rhône, la Drome, le Gard, la Haute-Garonne, l'Île de France, les Landes, le Loiret, les Pyrénées Orientales, la Vendée et au Cameroun. Les quatre cas de typhus des broussailles ont été contractés en Asie du Sud-Est où la maladie, transmise par des acariens, est endémique.

Figure 6. Répartition mensuelle des cas de rickettsioses diagnostiqués en 2015

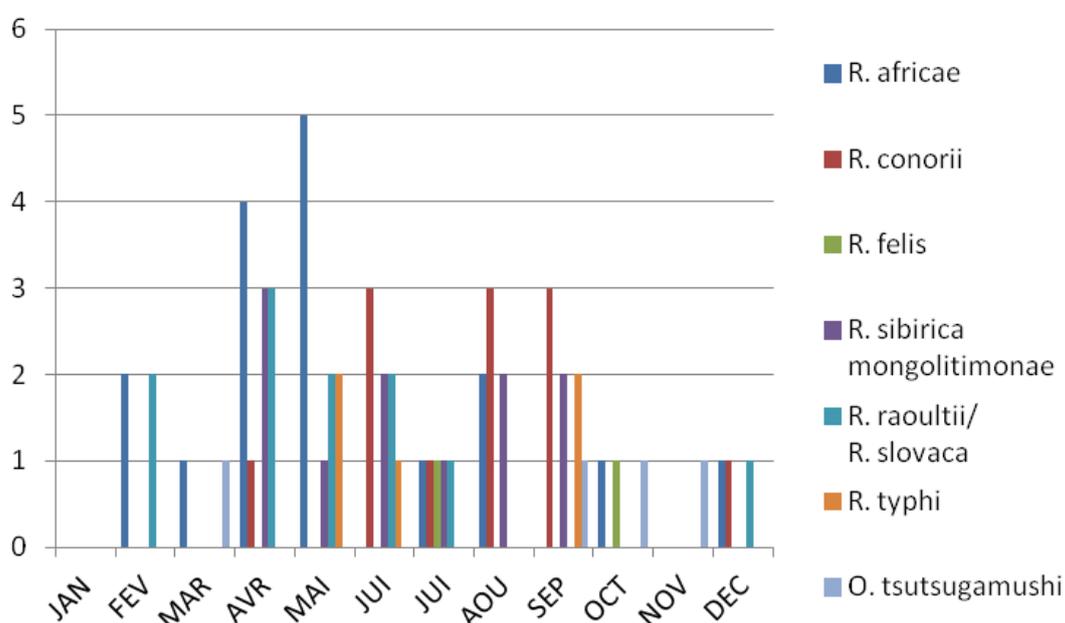


Tableau 4. Caractéristiques des patients chez qui un diagnostic de rickettsioses a été fait en 2014 (N = 46)

Infection	Sex ratio H/F	Age moyen, déviation standard (médiane)	Lieu de piqure
African tick-bite fever	9/7	50,1 +/- 15 (49)	Afrique du Sud, Zimbabwe, Grèce
Fièvre boutonneuse méditerranéenne	6/6	36,7 +/- 25,3 (36)	Bouches du Rhône, Hérault, Algérie, Maroc, Portugal
SENLAT	2/10	52,2 +/- 27,1 (63)	Bouches du Rhône, Hérault, Loiret, Puy-de-Dôme, Pyrénées-

			Atlantiques, Vendée
Lymphangitis Associated Rickettsiosis	7/4	51,4 +/- 20,8 (54)	Bouches du Rhône, Drome, Gard, Haute- Garonne, Ile de France, Landes, Loiret, Pyrénées Orientales, Vendée, Cameroun
Typhus murin	3/2	40 +/- 22,7 (32)	La Réunion, Californie, Vietnam
Typhus des broussailles	2/2	39,3 +/- 21,7 (31)	Cambodge, Philippines, Thaïlande
Fièvre boutonneuse à puces	1/1	70, 79	Var, Haute-Garonne

3.3.3 Diagnostic des Bartonelloses

En 2015, 163 cas d'infections à *Bartonella* sp. ont été diagnostiqués au CNR, contre 180 en 2014 (-9%). Cent quarante-trois de ces patients étaient atteints de **maladie des griffes du chat** (MGC). Un diagnostic d'**endocardite** a été porté chez 18 patients : à *B. quintana* (8 patients) ou *B. henselae* (10 patients). Un diagnostic de **bactériémie chronique** à *B. quintana* et d'**angiomatose bacillaire** ont été portés chez 1 patient chacun.

A. Diagnostic sérologique

Cent un échantillons de sérums (pour 35 patients) se sont révélés positifs (taux d'IgG \geq 1:100) en sérologie. Les sérums positifs étaient majoritairement ceux de patients atteints d'endocardite.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Cent soixante-treize des 2194 prélèvements adressés pour diagnostic moléculaire, pour **145** patients, se sont révélés positifs.

C. Diagnostic par culture

En outre, 16 souches de *Bartonella* ont été cultivées en 2015, dont 6 souches de *B. henselae* et 7 souches de *B. quintana* humaines, 1 souche de *B. florenciae* de musaraigne de la région PACA et 2 souches de *B. senegalensis* de tiques du Sénégal (cf Tableau sur le site Web du CNR).

D. Maladie des griffes du chat

Un diagnostic de maladie des griffes du chat (MGC) a été porté chez **143 patients** (Figure 7). Cinquante (50,3%) des patients étaient de sexe masculin. L'âge moyen des patients atteints de MGC était de 25,8 ans +/- 17,8, allant de 1 à 78 ans (médiane 20,5 ans). Cette population de patients était plus jeune que les autres patients atteints d'autres formes de bartonelloses (Tableau 5). De plus, les hommes et femmes atteints de MGC étaient sensiblement du même âge que les hommes, avec un âge moyen de 25,8 ans +/- 15,4 (médiane 23,5 ans) contre 25,6 ans +/- 19,9 (médiane 17 ans). La figure 7 montre la répartition des cas de MGC en fonction du mois de diagnostic avec une forte saisonnalité, déjà observée au cours des années précédentes : 77,6% des cas sont diagnostiqués de septembre à mars. La répartition géographique des cas de MGC (Figure 8) montrait une prédominance des cas dans le ¼ sud-ouest de la France, comme en 2013 et en 2014 : la région Midi-Pyrénées arrivait en tête avec 20,7% des cas suivie par la région Poitou-Charentes (17,8%). Les cas de maladie des griffes du chat en région PACA ne représentaient que 12,6% de l'ensemble des diagnostics au niveau national malgré le biais que représente la présence du CNR dans cette région.

Figure 7. Répartition temporelle des cas de maladies des griffes du chat en 2015 par mois de diagnostic

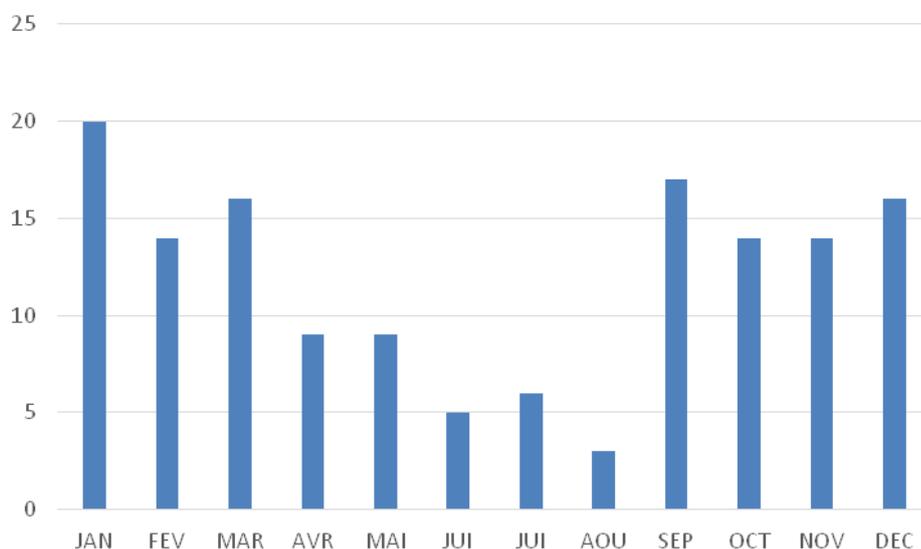
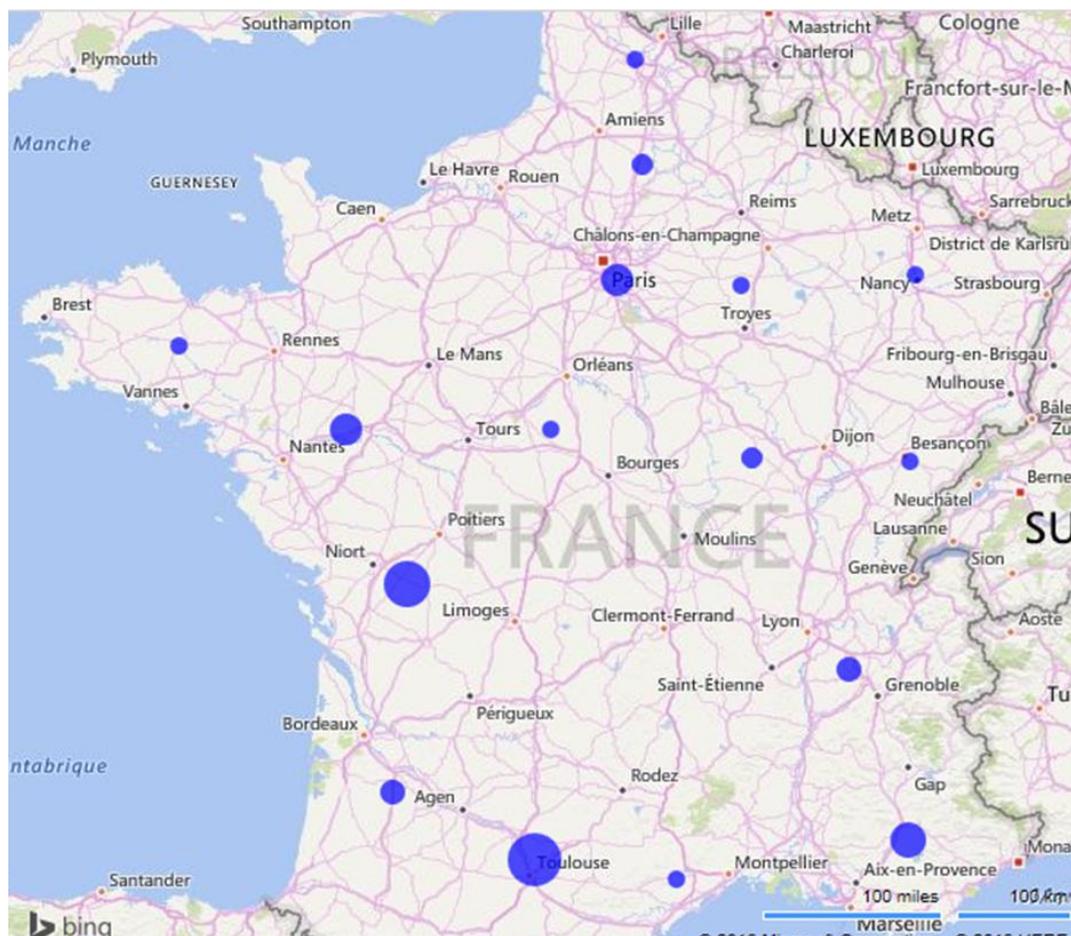


Figure 8. Répartition géographique des cas de maladie des griffes du chat diagnostiqués par le CNR en France en 2015



E. Autres bartonelloses

Le tableau 6 montre les autres diagnostics de bartonelloses établis par le CNR ainsi que les caractéristiques des patients. Un diagnostic d'endocardite à *B. quintana* a été porté chez 8 patients, d'endocardite à *B. henselae* chez 10 patients, de bactériémie à *B. quintana* chez 1 patient SDF et d'angiomatose bacillaire chez un patient VIH positif.

Tableau 5. Bartonelloses autres que la maladie des griffes du chat : Caractéristiques démographiques

Infection	Nombre de cas	Sex ratio H/F	Age moyen, déviation standard (médiane)	Région d'origine
Endocardite à <i>B. henselae</i>	10	9/1	52,1 +/- 17,9 (48)	Aquitaine, Auvergne, Centre, Franche-Comté, Midi-Pyrénées, PACA, Rhône-Alpes, Grande Bretagne, USA
Endocardite à <i>B. quintana</i>	8	6/2	52,9 +/- 20,5 (58)	Bourgogne, Bretagne, Ile de France, PACA, Grande Bretagne, Italie
Bactériémie à <i>B. quintana</i>	1	1/0	43	PACA
Angiomatose bacillaire	1	1/0	34	Ile de France

3.3.4 Représentativité des données du CNR

Aucune des maladies surveillées par le CNR des rickettsioses, bartonelloses et de la fièvre Q n'étant à déclaration obligatoire, et plusieurs kits diagnostiques étant disponibles sur le marché pour ces pathologies, les données du CNR ne reflètent que partiellement leur épidémiologie au niveau national. En témoigne la sur-représentation des échantillons adressés par des laboratoires de la région PACA où est situé le CNR. Il en va de même pour le nombre de diagnostics. En 2014, sur recommandation du comité des CNR, nous avons sollicité les laboratoires CERBA, BIOMNIS, ainsi que les laboratoires de microbiologie des CHU de Bordeaux, Lyon, Nantes, Paris et Strasbourg pour obtenir leur activité en nombres de tests pour diagnostic de rickettsiose, bartonellose et fièvre Q qui leur avaient été adressés dans l'année. Malheureusement, outre le fait que certains laboratoires n'ont pas souhaité répondre à notre demande, la diversité des informations transmises et des tests utilisés par ceux qui ont répondu, avec notamment des valeurs-seuil différentes pour la sérologie, n'ont pas permis une analyse homogène. En conséquence, cette démarche n'a pas été renouvelée cette année.

En revanche, pour essayer d'approcher la réalité de l'épidémiologie de la fièvre Q en France, nous avons programmé pour l'année 2016 une analyse des données du PMSi sur la fièvre Q en collaboration avec l'agence Santé Publique France (Docteur Alexandra MAILLES).

3.3.5 Enquête sur les moyens diagnostiques de la fièvre Q en France

Nous avons souhaité proposer en 2016 aux laboratoires de microbiologie français de participer à une enquête sur les tests diagnostiques (sérologie et PCR) mis en œuvre pour la fièvre Q. Cette enquête, sous la forme d'un questionnaire online a été proposée aux bactériologistes des CHU français au travers de l'association AZAY. D'autres centres hospitaliers régionaux ont également été contactés. Dix-huit chefs de laboratoires ont répondu à l'enquête, incluant le Pr Richard Bonnet (CHU Clermont Ferrand), le Dr Catherine Branger (CH Colombes), le Pr Sandrine Castelain (CHU Amiens), le Pr Vincent Cattoir (CHU Caen), le Dr Eric Garnotel (HIA Laveran, Marseille), le Pr Alain Goudeau (CHRU Tours), le Pr Benoit Jaulhac (CHU Strasbourg), le Pr Nicolas Lévêque (CHU Poitiers), le Pr Jean-Luc Mainardi (HEGP Paris), le Pr Max Maurin (CHU Grenoble), le Pr Francis Mégraud (CHU Bordeaux), le Pr Catherine Neuwirth (CHU Dijon), le Pr Eric Oswald (CHU Toulouse), le Pr Patrick Plésiat (CHRU Besançon), le Pr Marie-Cécile Ploy (CHU Limoges), le Pr Bruno Pozzetto (CHU Saint Etienne), le Pr Sylvestre Tigaud (CHU Lyon) et le Pr François Vandenesch (CHU Lyon).

Sur ces dix-huit établissements, représentant 11 régions françaises, seize réalisent le diagnostic sérologique de la fièvre Q et deux adressent les demandes qu'ils reçoivent à un autre laboratoire (transfert entre hôpitaux d'un même groupement hospitalier à Lyon et Paris) ou au CNR (CHRU Besançon). La technique sérologique utilisée est l'immunofluorescence indirecte, la méthode de référence, dans 16 cas dont 12 laboratoires où le kit Focus Diagnostics Q Fever IFA IgG est utilisé, 2 laboratoires où le kit Vircell Coxiella burnetii IFA est utilisé (CHU Bordeaux, CHU Clermont-Ferrand), et 2 laboratoires qui utilisent les antigènes de phase 1 et 2 fournis par le CNR (HEGP Paris et CHRU Tours). Le laboratoire du CHU de Grenoble utilise les kits ELISA Vircell Coxiella burnetii IgG et IgM, et

celui du CHU de Poitiers la technique de fixation du complément (kit non renseigné), respectivement. Seize laboratoires reçoivent plus de 100 demandes de sérologie fièvre Q par an, et deux de 50 à 100 demandes (HIA Laveran, HEGP Paris). Les taux de positivité des tests sérologiques réalisés sur ces échantillons varient de 1 (CHU Limoges) à 21% (CHU Toulouse).

En ce qui concerne le diagnostic moléculaire de la fièvre Q, seuls quatre laboratoires réalisent la PCR (CHU Limoges, CHU Lyon, CHRU Tours, HEGP Paris). Deux utilisent une PCR « maison » (CHU Limoges, HEGP Paris) et deux le kit Progenie Real Cycler Coxi (CHU Lyon, CHRU Tours). Les laboratoires qui ne réalisent pas le diagnostic moléculaire de la fièvre Q adressent les demandes qui leur parviennent au CNR pour 12 d'entre eux et au CERBA et à Biomnis pour les deux autres. Six laboratoires reçoivent de 10 à 50 demandes de PCR *Coxiella* par an, et 10 laboratoires reçoivent moins de 10 demandes par an. Les taux de positivité des tests moléculaires réalisés sur ces échantillons varient de moins de 1% (CHU Limoges) à 10% (CHU Tours).

Au cours de cette enquête, le CNR a proposé la mise en place d'un contrôle de qualité de sérologie et de PCR. Dix-sept des 18 laboratoires ont répondu favorablement à la proposition de contrôle de qualité de sérologie, et les quatre laboratoires qui réalisent le diagnostic moléculaire à la proposition de contrôle de qualité de PCR. En conséquence, à partir de l'année 2017, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* va adresser une fois par an à chacun des laboratoires qui en ont émis le souhait un contrôle de qualité de sérologie (sous la forme d'un échantillon de sérum titré) et de PCR (sous la forme d'un échantillon d'ADN de concentration connue).

3.4. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France (échange des données, périodicité, analyse commune)

Le Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est en contact régulier avec l'Agence Santé Publique France, en la personne du Dr Alexandra Mailles. Par l'intermédiaire du Dr Mailles, le CNR fournit annuellement à l'ECDC ses données de surveillance de la fièvre Q dans le cadre de la surveillance des zoonoses.

3.5. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Il n'existe pas de programme de surveillance de la résistance aux anti-infectieux des microorganismes surveillés par le Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* car ces bactéries, soumises à peu de pression de sélection, n'ont pas, ou très peu, développé de résistance. Toutefois, la description de quelques souches de sensibilité diminuée à la doxycycline de *Coxiella burnetii* a motivé la recherche plus systématique des mutations décrites chez les patients suivis et traités à Marseille par le Pr Raoult. Dans ce cadre, la détermination de la CMI des souches (lorsqu'elles sont cultivables) à la doxycycline et des dosages sériques réguliers de taux de doxycycline sont réalisés chez les patients suivis et traités.

4 – ACTIVITES d'INFORMATION, de FORMATION et de CONSEIL

4.1 - Former et enseigner les maladies infectieuses et les maladies tropicales

L'URMITE : Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, dans laquelle est inclus le CNR prend une part importante dans l'enseignement des maladies infectieuses. Elle assure la responsabilité de la spécialité de master « **Maladies Transmissibles et Pathologies Tropicales** » (responsable : B. Lascola) au sein de la mention de Master « **Pathologie Humaine** » qui est elle-même dirigée par un des responsables d'équipe de l'URMITE (J-L Mège). La spécificité de cette spécialité est développer un enseignement intégré, centré autour de paradigmes infectieux afin de jeter les bases d'un approfondissement conceptuel des maladies infectieuses face aux enjeux représentés par l'émergence de nouvelles maladies infectieuses y compris le bioterrorisme, le renouveau de certaines autres et la résistance aux agents anti-infectieux. Elle s'adresse à des étudiants issus des filières scientifiques et de santé et a toujours réussi à mélanger ces deux populations pour un enrichissement mutuel. Le nombre de diplômés depuis 2004 a varié de 18 à 30 par an. La spécialité « Maladies Transmissibles et Pathologies Tropicales » a développé une politique d'accueil des étudiants du Sud qui a été soutenue par la Fondation « Infectiopôle Sud ». Les projets sont l'évolution de l'intitulé de la spécialité qui s'appellera « Maladies Infectieuses » et aura une double spécificité, recherche et professionnelle. Elle s'intégrera également dans le projet de master international intitulé « Sciences de la Santé et du Développement » qui impliquera les universités du Sud (Liban, Algérie, Tunisie, Maroc et Sénégal). Ce master visera, grâce à la visioconférence, à développer un enseignement sur place pour les scientifiques et étudiants de santé désireux de monter des projets sur les maladies infectieuses.

La formation des doctorants occupe une place importante dans l'activité de formation par la recherche du CNR. Les doctorants sont rattachés à l'école doctorale en Sciences de la Vie et de la Santé ED62 qui est dirigée par J-L Mège. En 2015, 88 doctorants et 9 post-doctorants étaient présents dans le laboratoire. Le nombre de Thèses soutenues de 2006 à 2015 (inclus) a été de 61.

La spécialité « Maladies Transmissibles et Pathologies Tropicales » agit en partenariat avec le CMIT (Collège des Enseignants de Maladies Infectieuses et Tropicales). Aussi s'adresse-t-elle aux professionnels de la santé et aux scientifiques qui désirent se spécialiser dans une démarche associant recherche fondamentale, recherche clinique et recherche appliquée au diagnostic et à la thérapeutique. Elle a pour vocation de former les futurs cadres du diagnostic et du médicament en association avec le monde industriel. Cette spécialité associe notamment recherche fondamentale et recherche clinique.

Trois axes essentiels sont développés dans cet enseignement :

1. Physiopathologie et épidémiologie des maladies infectieuses. En raison de l'orientation des laboratoires participant à l'enseignement, cette analyse sera surtout orientée sur les bactéries intracellulaires, les maladies infectieuses tropicales et le VIH.

2. Thérapeutique anti-infectieuse. Il pourra s'agir de travaux mêlant recherche clinique et recherche plus fondamentale ou recherche fondamentale pure avec analyse des mécanismes de résistance, essais de nouvelles drogues, etc.....

3. Analyse moléculaire des agents infectieux. Cet aspect permet d'appréhender les techniques moléculaires d'analyse des microorganismes (génomique, transcriptomique et protéomique) appliquées notamment à la phylogénie, à la taxonomie, à l'identification et au typage des agents infectieux. Bien évidemment, les deux axes précédents pourront aussi être abordés sous cet angle. L'équipement disponible sur les différentes plateformes des laboratoires permet à l'étudiant d'effectuer son master recherche tout en faisant l'apprentissage de l'utilisation des systèmes les plus récents de production de données à haut débit.

Sur le plan professionnel, ce master a deux objectifs essentiels. Pour les étudiants des filières santé, l'objectif sera de permettre d'acquérir les bases nécessaires à l'approche des maladies infectieuses de façon moderne, permettant ainsi de comprendre les méthodes et techniques actuelles tout en développant un esprit critique. Cet aspect devient actuellement indispensable pour tout praticien, y compris des disciplines cliniques, même si il ne débouche pas nécessairement sur un doctorat de recherche. Pour les étudiants des filières scientifiques, ce master représente un mode d'accès aux carrières dans l'encadrement des disciplines médicales, pharmaceutiques et scientifiques tant sur le plan de l'enseignement supérieur et de la recherche que dans le monde hospitalier et industriel. Toutefois, dans ce master recherche, les laboratoires d'accueil fourniront le plus grand nombre possible de postes en thèse d'Université par la mise à disposition de bourses de financements variés. Sur le plan Universitaire, les spécialités concernées sont :

En médecine :

Principalement les sous-sections maladies infectieuses et tropicales, bactériologie-virologie-hygiène (n°45)

les sections médecine interne (n° 53)

Parasitologie et mycologie (n° 45)

Thérapeutique (n° 48)

Biologie moléculaire (n° 44)

Immunologie (n° 47)

En pharmacie :

Sciences du médicament (n°40)

Sciences physico-chimiquesv pharmaceutiques (n° 39)

Sciences biologiques pharmaceutiques (n° 41)

En Sciences :

Biochimie-Biologie moléculaire (n°64)

Biologie cellulaire (n° 65)

L'enseignement théorique d'une durée de 5 semaines débute au mois de Novembre. Il comporte un tronc commun de 2 unités d'enseignement obligatoires, 2 unités d'enseignement spécifique obligatoires, 1 unité spécifique facultative.

L'unité facultative de la spécialité MTPT (Caractérisation et analyse des agents infectieux de culture et/ou d'identification difficiles) pourra être remplacée par un module d'une des autres spécialités.

Les unités d'enseignement de la spécialité MTPT se dérouleront à la Faculté de Médecine de Marseille à l'exception du module d'enseignement « Thérapeutique anti-infectieuse » qui se déroulera à Montpellier.

4.3 – Formation permanente

Dans le but de répondre **aux besoins technologiques de pointe** nécessaires pour mener à bien les projets de recherche, un certain nombre de compétences ont été récemment acquises par l'UMR. Ces compétences, qui se déclinent sous l'aspect de différentes plates-formes nécessitent une **formation des ingénieurs** à l'utilisation des **appareils nouvellement acquis**. Ainsi, les dernières formations dispensées dans l'UMR sont :

- Bioinformatique
- Biologie Moléculaire
- Hygiène et Sécurité

Des **formations thématiques dédiées** sont également suivies en fonction des besoins. Il s'agit de séminaires à thèmes organisés par le CNRS, l'INSERM, ou encore par certains fournisseurs. Ponctuellement, des **stages de formation** sont également proposés tels que :

- International FISH Course. Departement of Microbial Ecology (Vienne Autriche)
- Utilisation de la plateforme RNAi (Max Plank Institute, Berlin)
- Formation à l'expérimentation animale (Université Aix-Marseille et CNRS)
- Formation XLab ou Excel (Université Aix-Marseille ou CNRS)

Ces formations et remises à niveau des compétences sont proposées aux ITA concernés au cours des **réunions Ingenering**. Par ailleurs, tout membre de l'UMR peut directement solliciter une formation qui est ensuite validée par le Directeur de l'UMR.

4.4. – Le Site WEB

Présentation du Site Internet de l'Unité des Rickettsies

Le Site Internet de notre unité, dont l'adresse est la suivante <http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=349&titre=centre-national-de-referance-des-rickettsia-coxiella-et-bartonella> comprend l'ensemble des informations relatives à notre activité.

Sur ce site sont notamment référencés les aspects épidémiologiques, cliniques, diagnostiques et thérapeutiques des **maladies infectieuses et tropicales**, pour lesquelles nous sommes centre de **référence** OMS ou pour lesquels nous disposons d'une expertise internationale (plus de 10 publications internationales sur la thématique).

Ce site permet :

- L'accès à des **fiches d'informations synthétiques** téléchargeables sur nos différents domaines de compétence. Ces fiches comportent notamment les renseignements utiles pour la réalisation et l'envoi de prélèvements à l'unité à des fins diagnostiques ainsi que le ou les correspondants pour chaque thématique.
- L'accès à un **guide antibiotique** comportant les protocoles thérapeutiques de prise en charge des maladies infectieuses.
- L'accès à des **liens** permettant de télécharger :
 - Le dictionnaire de maladies infectieuses
 - Le livret d'enseignement des internes de la Fédération de Microbiologie de Marseille
 - Le livret d'hygiène et sécurité de l'Unité
 - Le Logiciel de Biologie Moléculaire, SVARAP
 - L'accès à un lien permettant une connexion au site des maladies infectieuses et tropicales de Marseille
- L'accès à plusieurs bases de données concernant les différentes souches découvertes par l'Unité (souches et génotypes).
 - L'accès à des **informations épidémiologiques** actualisées chaque semaine :
 - Sur l'évolution hebdomadaire de l'épidémiologie des infections diagnostiquées par la Fédération de Microbiologie à Marseille
 - Sur l'épidémiologie hebdomadaire des différentes actualités des infections diagnostiquées à travers le monde.
 - L'accès à des renseignements sur **l'enseignement** des maladies infectieuses à Marseille

et sur l'**organisation** de **stages** à l'Unité des Rickettsies.

Ce site donne donc la possibilité d'avoir :

- Une information et une formation rapide et de qualité sur n'importe quelle maladie infectieuse étudiée au sein de notre unité et d'accéder à des bases de connaissance téléchargeables.

5 – Travaux de recherche et publications du CNR

5.1 – TRAVAUX DE RECHERCHE EN COURS

5.1.1. Recherche sur les arthropodes vecteurs

Depuis l'année 2011 le développement de la plateforme « Animalerie » a permis le développement d'élevages d'arthropodes (tiques poux, puces, moustiques, punaises et triatomes) et des programmes de recherche sur les interactions "arthropodes – microorganismes".

Les élevages de tiques et de poux sont effectués sur lapins.

Les élevages de moustiques sont effectués sur souris mais aussi sur membranes artificielles.

Les élevages de puces, punaises, et triatomes sur membranes.

Les élevages de tiques et poux infectés par des rickettsies s'effectuent en conditions P3.

Les travaux sont effectués autour de 4 axes:

A- Elevages

Plusieurs espèces d'arthropodes sont maintenues : les tiques de chien *Rhipicephalus sanguineus*, les tiques de bétail africain *Amblyomma variegatum*, les tiques du mouton en Europe *Dermacentor marginatus*, le vecteur de la fièvre hémorragique à virus Crimée-Congo *Hyalomma marginatum rufipes* et une tique molle vecteur de la borreliose récurrente à tique en Afrique *Ornithodoros sonrai*. Le laboratoire a également un élevage de poux de corps *Pediculus humanus humanus* et de puces de chat *Ctenocephalides felis*, ainsi que des élevages de moustique-tigre, *Aedes albopictus*, et d'*Anopheles gambiae* forme moléculaire S, le principal vecteur du paludisme. Enfin, nous disposons d'élevages de punaises de lit *Cimex lectularius* et des punaises hématophages vecteurs de la maladie de Chagas, *Triatoma infestans*.

B- Etudes des relations vecteur-pathogène

Les expérimentations ont permis d'étudier les transmissions de *Rickettsia conorii* et *R. massiliae* dans *Rhipicephalus sanguineus*, de *R. africae* dans *Amblyomma variegatum* et de *R. slovaca* et *R. raoultii* dans *Dermacentor marginatus*. Des études des relations entre *R. felis*, l'agent de la fièvre boutonneuse à puce, et les moustiques, et entre *Bartonella quintana*, l'agent de la fièvre des tranchées, et les puces *Ctenocephalides felis*, sont en cours.

C- Etudes des populations de poux de tête et poux de corps

Le CNR poursuit l'étude de la spécialisation des poux de corps, vecteur de *Rickettsia prowazekii* et *Bartonella quintana*, et des poux de têtes.

5.1.2. Génomique et Protéomique

En 2015, parmi les génomes bactériens séquencés par le laboratoire 6 concernaient plus particulièrement les thématiques du laboratoire : il s'agissait de 3 génomes de *B. henselae*, 1 de *B. doshiae*, 1 de *B. schoenbuchensis* et 1 de *B. tribocorum*.

Un projet d'étude fonctionnelle des protéines par analyse génomique, y compris la recherche de

protéines exprimées malgré la présence de codon stop dans les gènes est en cours. Un second axe de recherche en protéomique est la recherche de protéines antigéniques d'intérêt diagnostique dans la perspective de mise au point de tests sérologiques de troisième génération en forme de test multiplexé intégrant directement des protéines antigéniques en lieu et place des microorganismes entiers. Un autre projet concerne les protéines exprimées différemment par les espèces de *Rickettsia* responsables d'infections de sévérités différentes. Enfin, la base de données de spectres MALDI-TOF développée pour l'identification rapide des arthropodes trouvés sur les patients ou dans leur environnement et adressés au CNR continue à être alimentée en nouveaux spectres, notamment en spectres d'espèces de puces, tiques et moustiques infectées par des rickettsies.

5.1.3. Transcriptomique

Le CNR développé un axe de recherche sur l'étude de l'expression des gènes chez les bactéries intracellulaires et un second sur l'étude de la réponse de l'hôte à l'infection *in vitro* et chez les patients. La réponse de l'hôte aux infections a été évaluée *in vitro* dans la configuration d'interaction entre différentes bactéries (*Coxiella burnetii*, *Tropheryma whipplei*, *Rickettsia prowazekii*) ou leurs ligands (lipopolysaccharide) et des cellules cibles du système immunitaire (macrophages) ou non (trophoblastes, cellules épithéliales...). La réponse de l'hôte a été étudiée chez des souris infectées par *C. burnetii* (analyse au niveau hépatique). De plus, l'étude transcriptionnelle a été effectuée au niveau périphérique (du sang total) chez des patients atteints de fièvre Q, notamment présentant des atteintes cardiaques (endocardites). Des prélèvements tissulaires (valves cardiaques, biopsies intestinales, escarres) ont permis l'analyse de l'expression des gènes *in situ* et ainsi permis de comparer les réponses locales et les réponses périphériques.

<i>Coxiella burnetii</i> :	Réponse transcriptionnelle au stress température (en cours) Diversité génomique (en cours)
<i>Rickettsia prowazekii</i> :	Différences transcriptionnelles entre une souche virulente et avirulente
<i>Rickettsia conorii</i> :	Mise au point d'outils pour l'analyse microarray Réponse transcriptionnelle à un stress nutritif Transcriptome <i>in vivo</i> (escars) RNome et analyse des ARN non codant (en cours)

Un modèle animal a également été développé pour étudier l'effet du sexe sur l'expression clinique de l'infection à *C. burnetii* : expression génique hépatique chez des souris mâles et femelles infectées par *C. burnetii*, castrées ou non.

5.2 - PUBLICATIONS 2015 SUR LES THEMES DE RECHERCHE DU CNR PAR LES PERSONNELS TITULAIRES ET PUBLICATIONS REFERENCEES DANS LE RAPPORT

- 1: Parola P, Mediannikov O, Dieme C, Raoult D. Reply to Slesak et al.: So much about Rickettsia felis infection to be discovered. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(48):E6595-6. doi: 10.1073/pnas.1517919112.
- 2: Simon L, De Martino S, Garnon J, Imperiale A, Argemi X, Raoult D, Hansmann Y. Positron emission tomography to diagnose chronic Q fever. Med Mal Infect. 2015;45(10):420-2. doi: 10.1016/j.medmal.2015.09.003.
- 3: Tomasiewicz K, Krzowska-Firyeh J, Bielec D, Socolovschi C, Raoult D. First case of imported African tick-bite fever in Poland - Case report. Ann Agric Environ Med. 2015;22(3):412-3. doi: 10.5604/12321966.1167703.
- 4: Mourembou G, Lekana-Douki JB, Mediannikov O, Nzondo SM, Kouna LC, Essone JC, Fenollar F, Raoult D. Possible Role of Rickettsia felis in Acute Febrile Illness among Children in Gabon. Emerg Infect Dis. 2015;21(10):1808-15. doi:10.3201/eid2110.141825.
- 5: Drali R, Shako JC, Davoust B, Diatta G, Raoult D. A New Clade of African Body and Head Lice Infected by Bartonella quintana and Yersinia pestis-Democratic Republic of the Congo. Am J Trop Med Hyg. 2015;93(5):990-3. doi:10.4269/ajtmh.14-0686.
- 6: Kumsa B, Socolovschi C, Almeras L, Raoult D, Parola P. Occurrence and Genotyping of Coxiella burnetii in Ixodid Ticks in Oromia, Ethiopia. Am J Trop Med Hyg. 2015;93(5):1074-81. doi: 10.4269/ajtmh.14-0758.
- 7: Eldin C, Perreal C, Mahamat A, Djossou F, Edouard S, Raoult D. Antibiotic susceptibility determination for six strains of Coxiella burnetii MST 17 from Cayenne, French Guiana. Int J Antimicrob Agents. 2015;46(5):600-2. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.08.007.
- 8: Fournier PE, Drancourt M, Aboudharam G, Raoult D. Paleomicrobiology of Bartonella infections. Microbes Infect. 2015;17(11-12):879-83. doi:10.1016/j.micinf.2015.09.002.
- 9: Mayxay M, Sengvilaipaseuth O, Chanthongthip A, Dubot-Pérès A, Rolain JM, Parola P, Craig SB, Tulsiani S, Burns MA, Khanthavong M, Keola S, Pongvongsa T, Raoult D, Dittrich S, Newton PN. Causes of Fever in Rural Southern Laos. Am J Trop Med Hyg. 2015;93(3):517-20. doi: 10.4269/ajtmh.14-0772.
- 10: Leulmi H, Bitam I, Berenger JM, Lepidi H, Rolain JM, Almeras L, Raoult D, Parola P. Correction: Competence of Cimex lectularius Bed Bugs for the Transmission of Bartonella quintana, the Agent of Trench Fever. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(6):e0003871. doi: 10.1371/journal.pntd.0003871.

- 11: Dieme C, Bechah Y, Socolovschi C, Audoly G, Berenger JM, Faye O, Raoult D, Parola P. Transmission potential of *Rickettsia felis* infection by *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(26):8088-93. doi:10.1073/pnas.1413835112.
- 12: Yssouf A, Almeras L, Berenger JM, Laroche M, Raoult D, Parola P. Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph by MALDI-TOF MS. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015;6(5):579-86. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.04.013.
- 13: Leulmi H, Bitam I, Berenger JM, Lepidi H, Rolain JM, Almeras L, Raoult D, Parola P. Competence of *Cimex lectularius* Bed Bugs for the Transmission of *Bartonella quintana*, the Agent of Trench Fever. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(5):e0003789. doi: 10.1371/journal.pntd.0003789.
- 14: Vayssier-Taussat M, Cosson JF, Degeilh B, Eloit M, Fontanet A, Moutailler S, Raoult D, Sellal E, Ungeheuer MN, Zylbermann P. How a multidisciplinary 'One Health' approach can combat the tick-borne pathogen threat in Europe. *Future Microbiol*. 2015;10(5):809-18. doi: 10.2217/fmb.15.15.
- 15: D'Amato F, Eldin C, Georgiades K, Edouard S, Delerce J, Labas N, Raoult D. Loss of TSS1 in hypervirulent *Coxiella burnetii* 175, the causative agent of Q fever in French Guiana. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015;41:35-41. doi: 10.1016/j.cimid.2015.04.003.
- 16: Million M, Raoult D. Recent advances in the study of Q fever epidemiology, diagnosis and management. *J Infect*. 2015;71 Suppl 1:S2-9. doi:10.1016/j.jinf.2015.04.024.
- 17: Eldin C, Mahamat A, Djossou F, Raoult D. Rainfall and sloth births in may, Q fever in July, Cayenne, French Guiana. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(5):979-81. doi: 10.4269/ajtmh.14-0751.
- 18: Gouriet F, Levy PY, Casalta JP, Zandotti C, Collart F, Lepidi H, Cautela J, Bonnet JL, Thuny F, Habib G, Raoult D. Etiology of Pericarditis in a Prospective Cohort of 1162 Cases. *Am J Med*. 2015;128(7):784.e1-8. doi:10.1016/j.amjmed.2015.01.040.
- 19: Ka MB, Gondois-Rey F, Ghigo E, Raoult D, Olive D, Mege JL. Imbalance of circulating lymphoid cells in Q fever endocarditis. *Pathog Dis*. 2015;73(2):1-3. doi: 10.1093/femspd/ftu010.
- 20: Dahmani M, Marié JL, Mediannikov O, Raoult D, Davoust B. First identification of *Anaplasma platys* in the blood of dogs from French Guiana. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2015;15(2):170-2. doi: 10.1089/vbz.2014.1720.
- 21: Yssouf A, Almeras L, Terras J, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Detection of *Rickettsia* spp in ticks by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003473. doi: 10.1371/journal.pntd.0003473.
- 22: Dieme C, Parola P, Guernier V, Lagadec E, Le Minter G, Balleydier E, Pagès F, Dellagi K, Tortosa P, Raoult D, Socolovschi C. *Rickettsia* and *Bartonella* species in fleas from Reunion Island. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(3):617-9. doi:10.4269/ajtmh.14-0424.

23: Watt G, Lacroix A, Pachirat O, Baggett HC, Raoult D, Fournier PE, Tattevin P. Prospective comparison of infective endocarditis in Khon Kaen, Thailand and Rennes, France. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(4):871-4. doi:10.4269/ajtmh.14-0689.

24. Mirabel M, Rattanavong S, Frichitthavong K, Chu V, Kesone P, Thongsith P, Jouven X, Fournier PE, Dance DA, Newton PN. Infective endocarditis in the Lao PDR: clinical characteristics and outcomes in a developing country. *Int J Cardiol.* 2015;180:270-3. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.11.184.

25: Balleydier E, Camuset G, Socolovschi C, Moiton MP, Kuli B, Foucher A, Poubeau P, Borgherini G, Wartel G, Audin H, Raoult D, Filleul L, Parola P, Pagès F. Murine typhus, Reunion, France, 2011-2013. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(2):316-9. doi: 10.3201/eid2102.140850.

26: Angelakis E, Patrick G, Peloni JM, Wey PF, Perreal C, Raoult D. *Orientia tsutsugamushi* in lung of patient with acute respiratory distress syndrome, France, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(2):373-5. doi:10.3201/eid2102.140860.

27: Dahmani M, Loudahi A, Mediannikov O, Fenollar F, Raoult D, Davoust B. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6(2):198-203. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.12.007.

28: Edouard S, Nabet C, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. Bartonella, a common cause of endocarditis: a report on 106 cases and review. *J Clin Microbiol.* 2015;53(3):824-9. doi: 10.1128/JCM.02827-14.

29: Gaillard E, Socolovschi C, Fourcade C, Lavigne JP, Raoult D, Sotto A. [A case of severe sepsis with disseminated intravascular coagulation during *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection]. *Med Mal Infect.* 2015;45(1-2):57-9. doi: 10.1016/j.medmal.2014.10.005.

30: Kumsa B, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks in Oromia, Ethiopia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6(1):8-15. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.08.001.

31: Gastellier L, Lanternier F, Renvoisé A, Rivière S, Raoult D, Lortholary O, Lecuit M. Nonruptive fever revealing murine typhus in a traveler returning from Tunisia. *J Travel Med.* 2015;22(1):67-9. doi: 10.1111/jtm.12154.

5.3. – COMMUNICATIONS 2015

Fournier P.E. Blood culture-negative endocarditis. Communication orale. 13th International Symposium on Modern Concepts in Endocarditis and Cardiovascular Infections. June 4-6, 2015. Rio de Janeiro, Brazil. Conférence invitée.

Lamas C., Fournier P.E., Zappa M., Joly T., Brandao D., Araujo C., Da Silva J., Abrantes A.J., Dantas A., Barbosa G.F., Golebiovski W.F. and Weksler C. Blood culture-negative endocarditis and PCR diagnosis in valve tissue: a case series from 2006 to 2014. 13th International Symposium on Modern Concepts in Endocarditis and Cardiovascular Infections. June 4-6, 2015. Rio de Janeiro, Brazil. Poster.

Fournier P.E. Paleomicrobiology of *Bartonella*. Oral communication. International Congress on Rickettsia and other intracellular bacteria. June 13-16, 2015. Lausanne, Switzerland. Conférence invitée.