

Rapport annuel d'activité

2020

**Centre de national de référence
des Rickettsies, *Coxiella* et
*Bartonella***

**Année d'exercice
2019**



SOMMAIRE

1.	MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	7
2.	ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR.....	8
2.1.	Evolution des techniques	8
2.2.	Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	8
2.3.	Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	8
2.4.	Collections de matériel biologique.....	8
2.5.	Activités d'expertise.....	9
2.6.	Activités de séquençage	10
3.	ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	11
3.1.	Description du réseau de partenaires	12
3.1.1.	Collaborations avec l'ECDC	12
3.1.2.	Coopérations institutionnelles	13
3.1.3.	Collaborations avec les pays étrangers.....	13
3.1.4.	Collaborations avec l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	15
3.2.	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	16
3.2.1.	Surveillance des rickettsioses, de la fièvre Q et des bartonelloses.....	16
3.2.2.	Diagnostic de la fièvre Q	16
3.2.3.	Diagnostic des Rickettsioses.....	21
3.2.4.	Diagnostic des Bartonelloses	23
3.2.5.	Représentativité des données du CNR	27
3.3.	Surveillance de la résistance des agents pathogènes anti-infectieux	27
3.4.	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	27
3.5.	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	27
4.	ALERTE	28
5.	ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	28

5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé	28
5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires	29
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	29
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	29
6.1.1. Fièvre Q	29
6.1.2. <i>Rickettsia</i>	30
6.1.3. <i>Bartonella</i>	30
6.2 – Liste des publications et communications de l'année 2019, ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	31
6.2.1. Fièvre Q	31
6.2.2. Rickettsies.....	32
6.2.3. <i>Bartonella</i>	33
COMMUNICATIONS.....	33
7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	34
8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES.....	34
8.1. Démarche qualité	34
8.2. Activité de recherche en 2019 et 2020	35
8.3. Activité d'expertise	35
ANNEXES 2019	36
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR.....	37
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	37
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	38
1.3 L'équipe impliquée dans les activités du CNR	39
1. 4. Locaux et équipements	41
1. 5. Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR	41
1.5.1. Les activités de culture du CNR.....	42
1.5.2. Les Plateformes	42

1.5.3. Les principaux équipements.....	43
1.5.4. Plateformes techniques de l'IHU auxquelles le CNR a accès	45
1.6. Collections de matériel biologique.....	47
1.7. Démarche qualité du laboratoire	55
<i>Annexe 2 : Capacités techniques du CNR</i>	<i>56</i>
2.1. Liste des techniques de référence	56
A. La sérologie	56
B. Détection moléculaire	57
C. Culture	58
2.2. Liste des techniques recommandées par le CNR	59
<i>Annexe 3 : Autres Informations</i>	<i>60</i>

Résumé analytique des activités pour l'année 2019

La fièvre Q, les rickettsioses et bartonelloses sont des zoonoses communes et endémiques en France, grevées d'un taux de morbidité élevé. Depuis 2017, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est installé au sein de l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection à Marseille. Au cours de l'année 2019, le CNR n'a pas connu de changement majeur de personnel.

En 2019, le CNR a reçu **15 265** échantillons de sérum provenant de **12 228** patients. Tous les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps contre *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. et *Bartonella* sp. De plus, **8 656** échantillons biologiques divers provenant de **5 062** patients ont été reçus pour culture et/ou détection moléculaire. Pour les diagnostics de fièvre Q, rickettsioses et bartonelloses, les échantillons de sérum étaient adressés comme demandes primaires dans **68.1**, **72.3** et **57.8%** des cas respectivement. En 2019, le CNR a diagnostiqué **166** nouveaux cas de fièvre Q aiguë (-8.3% par rapport à 2018), **83** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée (+27.7% par rapport à 2018), **42** nouveaux cas de rickettsioses (-32% par rapport à 2018) et **100** nouveaux cas de bartonelloses (-26% par rapport à 2018).

En ce qui concerne la fièvre Q, nous avons observé en France métropolitaine une diminution du nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë en 2019 (**128** vs 143 cas en 2018, -10.5%) mais une forte augmentation, comme l'année précédente, du nombre de diagnostics de formes focalisées de la fièvre Q (fièvre Q chronique), avec **74** cas en 2019 contre **47** en 2018 (+57.4%). L'année 2019 a été marquée par une épidémie de fièvre Q aiguë survenue dans le lycée agricole d'Oloron Sainte-Marie au cours de laquelle plusieurs élèves et membres du personnel ont été infectés. Cette épidémie qui est survenue entre janvier et mai 2020, a été causée par le troupeau de brebis du lycée dont le laboratoire national de la fièvre Q a démontré l'infection par la fièvre Q.

En Guyane française, le nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë a légèrement augmenté entre 2018 et 2019, passant de **27** à **30** cas (+11%).

Pour ce qui est des rickettsies, le nombre de diagnostics de rickettsioses faits au CNR a diminué, avec **42** diagnostics (vs 62 en 2018, -32%), dont **13** cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite (*R. raoultii* et *R. slovaca*), **6** cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne (*Rickettsia conorii* et *R. massiliae*), **11** cas d'African tick-bite fever (*R. africae*), **4** cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), **1** cas de typhus murin (*R. typhi*), **2** cas de fièvre boutonneuse à puce (*R. felis*), **2** cas de typhus des broussailles (*Orientia tsutsugamushi*) et **3** cas de dont l'espèce causale n'a pas été identifiée.

Au cours de l'année 2019, le nombre de cas d'infections à *Bartonella* a diminué par rapport à 2018, avec **100** patients (-26%), dont **83** maladies des griffes du chat, **13** endocardites et **4** autres formes. Par rapport à 2018, le nombre de diagnostics de maladie des griffes du chat (**83** vs 117, -29.0%) a diminué alors que le nombre de diagnostics d'endocardites est resté stable (**13** vs 12, +8.3%).

Au cours de l'année 2019, le CNR a également passé une convention de coopération scientifique avec le laboratoire national de référence de la fièvre Q (ANSES, Sophia-Antipolis), formalisant ainsi la collaboration ancienne entre les deux laboratoires, et a entamé une collaboration scientifique avec l'INRA au travers du projet Expaircox porté par le Dr Elsa Jourdain.

Analytical summary of activities for year 2019

Q fever, rickettsioses and bartonellosis are common and endemic zoonoses in France, with a high morbidity rate. Since 2017, the CNR for Rickettsiae, Coxiella and Bartonellae is located at the Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection in Marseille. During 2019, the CNR did not experience any major personnel changes.

In 2019, the CNR received 15,265 serum samples from 12,228 patients. All sera were tested for the presence of antibodies against *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp. In addition, 8,656 miscellaneous biological samples from 5,062 patients were received for culture and / or molecular detection. For diagnoses of Q fever, rickettsioses and bartonellosis, serum samples were sent as primary requests in 68.1, 72.3 and 57.8% of cases respectively. In 2019, the CNR diagnosed 166 new cases of acute Q fever (-8.3% compared to 2018), 83 new cases of persistent focused Q fever (+ 27.7% compared to 2018), 42 new cases of rickettsioses (-32 % compared to 2018) and 100 new cases of bartonellosis (-26% compared to 2018).

With regard to Q fever, in mainland France we observed a decrease in the number of diagnoses of acute Q fever in 2019 (128 vs 143 cases in 2018, -10.5%) but a sharp increase, as in the previous year, in number of diagnoses of persistent focused forms of Q fever (chronic Q fever), with 74 cases in 2019 against 47 in 2018 (+ 57.4%). The year 2019 was marked by an acute Q fever epidemic in the agricultural high school of Oloron Sainte-Marie in which several students and staff were infected. This epidemic, which occurred between January and May 2020, was caused by the high school flock of ewes whose national Q fever laboratory demonstrated infection with Q fever.

In French Guiana, the number of acute Q fever diagnoses increased slightly between 2018 and 2019, from 27 to 30 cases (+ 11%).

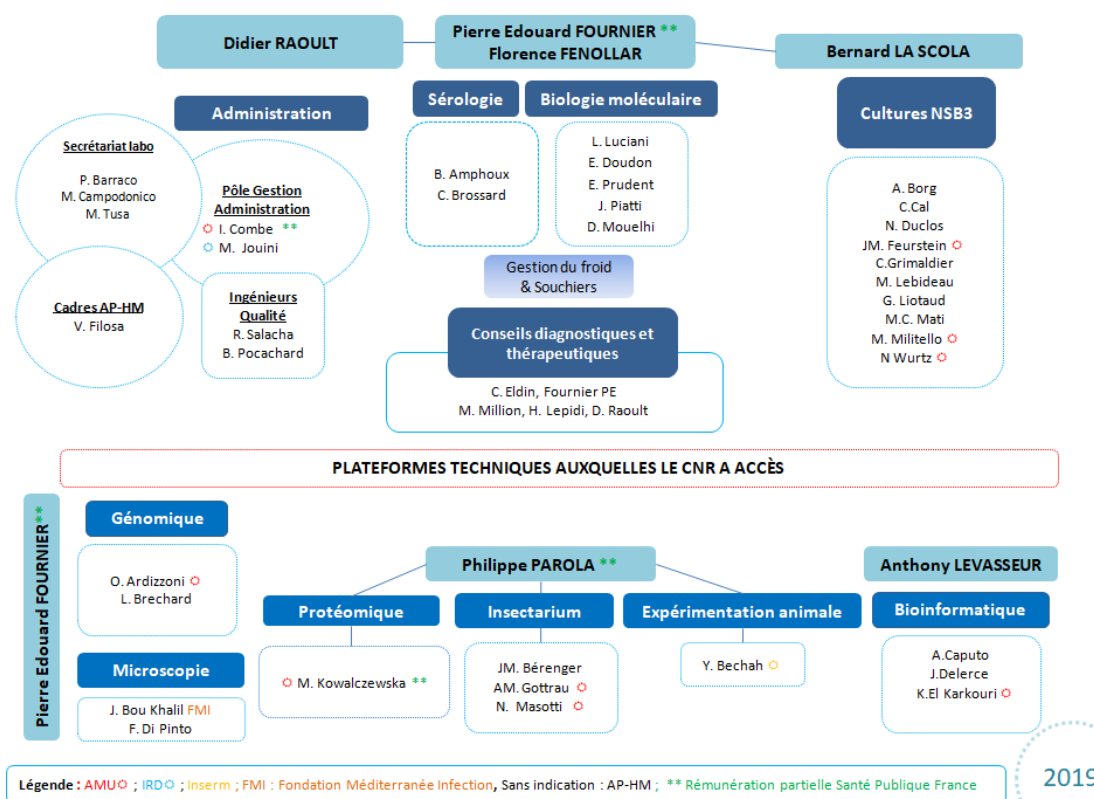
Regarding rickettsiae, the number of rickettsial diagnoses made at the CNR decreased, with 42 diagnoses (vs 62 in 2018, -32%), including 13 cases of Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite (*R. raoultii* and *R. slovaca*), 6 cases of Mediterranean spotted fever (*R. conorii* and *R. massiliae*), 11 cases of African tick-bite fever (*R. africae*), 4 cases of Lymphangitis Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), 1 case of murine typhus (*R. typhi*), 2 cases of boutonneuse flea (*R. felis*), 2 cases of scrub typhus (*Orientia tsutsugamushi*) and 3 cases of which the causal species has not been identified.

During 2019, the number of cases of Bartonella infections decreased compared to 2018, with 100 patients (-26%), including 83 cat scratch diseases, 13 endocarditis and 4 other forms. Compared to 2018, the number of cat scratch disease diagnoses (83 vs 117, -29.0%) decreased while the number of endocarditis diagnoses remained stable (13 vs 12, + 8.3%).

In 2019, the FCR also signed a scientific cooperation agreement with the national reference laboratory for Q fever (ANSES, Sofia-Antipolis), thus formalizing the long-standing collaboration between the two laboratories, and started a scientific collaboration with INRA through the Expaircox project directed by Dr Elsa Jourdain.

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

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



RESPONSABLES

Responsable : Professeur Pierre-Edouard FOURNIER (PU-PH) et responsable adjoint : Professeur Didier RAOULT (PU-PH).

DEMARCHES QUALITE

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. Le CNR s'est doté d'un guide de bonne exécution des analyses (GBEA) pour toutes les activités de culture, sérologie et détection moléculaire du laboratoire.

2. ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR

RESUME DE LA PRODUCTION D'EXPERTISE EN 2019

- * Plus de **20 000** échantillons cliniques reçus,
- * Plus de **100 000** analyses réalisées,
- * Isolement de 17 souches de *Coxiella burnetii*, de 9 souches de *Rickettsia*
- * Séquençage de 16 génomes de *Coxiella burnetii*, 2 génomes de *Rickettsia* et 1 génome de *Bartonella*.

2.1. Evolution des techniques

L'identification des arthropodes reçus par le CNR est à présent systématiquement réalisée en première intention par spectrométrie de masse (MALDI TOF).

2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

La comparaison de la technique de sérologie par immunofluorescence indirecte « maison » du CNR avec les kits FOCUS et VIRCELL, débutée en 2018, n'a pu être poursuivie qu'en 2020.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNR fournit antigènes et ADN à plusieurs laboratoires français, pour le diagnostic de fièvre Q, rickettsioses et bartonelloses.

2.4. Collections de matériel biologique

En 2019, le CNR a reçu **15265** échantillons de sérums et **8656** échantillons biologiques divers (sang, biopsies, liquides de ponctions, arthropodes ...)

De plus, **17** souches de *Coxiella burnetii* et **9** souches de *Rickettsia* ont été cultivées.

2.5. Activités d'expertise

Echantillons		Type d'analyses réalisées
Type	Nombre	
Souches	0	
Sérums		SEROLOGIES
France	15133	
Etranger	132	<u>Antigènes testés pour tout sérum</u> : <i>Rickettsia conorii</i>, <i>R. typhi</i>, <i>Coxiella burnetii</i>, <i>Bartonella henselae</i>, <i>B. quintana</i>, <i>Anaplasma phagocytophilum</i>, <i>Francisella tularensis</i> + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Europe et bassin méditerranéen</u> : <i>R. slovaca</i>, <i>R. massiliae</i>, <i>R. aeschlimannii</i>, <i>R. helvetica</i>, <i>R. raoultii</i>, <i>R. sibirica mongolitimonae</i> Ou + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Afrique sub-saharienne</u> : <i>R. africae</i> Ou + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Asie</u> : <i>R. sibirica mongolitimonae</i>, <i>R. japonica</i>, <i>R. honei</i>, <i>Orientia tsutsugamushi</i> (souches gilliam et Kawazaki), <i>Neorickettsia sennetsu</i> Ou + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Amérique</u> : <i>R. rickettsii</i>, <i>R. parkeri</i> Ou + <u>Antigènes testés en plus si patient infecté en Australie</u> : <i>R. australis</i>, <i>R. honei</i>
Autres types de prélèvements		PCR
France	8545	PCR <i>C. burnetii</i> (2 gènes), <i>Rickettsia</i> sp. (2 gènes) ou <i>Bartonella</i> sp. (2 gènes) plus éventuellement ARNr 16S et ARNr 18S en fonction de la demande et du contexte épidémiologique et clinique.
Etranger	111	CULTURE CELLULAIRE Si PCR positive et échantillon reçu dans des conditions permettant la culture, culture sur cellules endothéliales.

DELAIS MOYENS DE RESTITUTION DES RESULTATS

Sérologies	48 h
PCR	48 – 72 h
Culture	10j à 2 mois

2.6. Activités de séquençage

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

- **OUI :**
 - **Accès interne : 4 séquenceurs Illumina MiSeq, séquenceur Minion Oxford Nanopore**

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

- **OUI :**
 - **Accès interne : Logiciels utilisés Assemblage SPADES, SOAP, A5; Annotation Prokka.**

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

- **OUI, pour activités de :**
 - **Surveillance : Pangénome de *Coxiella burnetii* en collaboration avec le LNR de la fièvre Q (Dr Elodie Rousset, Sophia Antipolis).**

Le séquençage est utilisé par le CNR, pour les analyses bio-informatiques suivantes : wgMLST, analyse phylogénétique.

Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :

- **Nombres de séquences réalisées dans l'année : 16 génomes de *Coxiella burnetii*, 2 génomes de *Rickettsia* et 1 de *Bartonella***
- **Modalités de sélection des souches pour séquençage : sélection de souches représentatives des principaux génotypes de *C. burnetii*.**

Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastq files) :

Dans des bases de données fermées propres au CNR. Les séquences génomiques ne sont déposées dans GenBank que si elles font l'objet d'une publication.

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

ELEMENTS CLEFS DE L'ANNEE

En 2019, le CNR a reçu **15 265** échantillons de sérum provenant de **12 228** patients. Tous les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps contre *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. et *Bartonella* sp. De plus, **8 656** échantillons biologiques divers provenant de **5 062** patients ont été reçus pour culture et/ou détection moléculaire. Pour les diagnostics de fièvre Q, rickettsiose et bartonellose, les échantillons de sérum étaient adressés comme demandes primaires dans **68.1**, **72.3** et **57.8%** des cas respectivement. En 2019, le CNR a diagnostiqué **166** nouveaux cas de fièvre Q aiguë (-8.3% par rapport à 2018), **83** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée (+27.7% par rapport à 2018), **42** nouveaux cas de rickettsioses (-32% par rapport à 2018) et **100** nouveaux cas de bartonelloses (-26% par rapport à 2018).

En ce qui concerne la fièvre Q, nous avons observé en France métropolitaine une diminution du nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë en 2019 (**128** vs 143 cas en 2018, -10.5%) mais une forte augmentation, comme l'année précédente, du nombre de diagnostics de formes focalisées de la fièvre Q (fièvre Q chronique), avec **74** cas en 2019 contre **47** en 2018 (+57.4%). L'année 2019 a été marquée par une épidémie de fièvre Q aiguë survenue dans le lycée agricole d'Oloron Sainte-Marie au cours de laquelle plusieurs élèves et membres du personnel ont été infectés. Cette épidémie qui est survenue entre janvier et mai 2020, a été causée par le troupeau de brebis du lycée dont le laboratoire national de la fièvre Q a démontré l'infection par la fièvre Q.

En Guyane française, le nombre de diagnostics de fièvre Q aiguë a légèrement augmenté entre 2018 et 2019, passant de **27** à **30** cas (+11%).

Pour ce qui est des rickettsies, le nombre de diagnostics de rickettsioses faits au CNR a diminué, avec **42** diagnostics (vs 62 en 2018, -32%), dont **13** cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite (*R. raoultii* et *R. slovaca*), **6** cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne (*Rickettsia conorii* et *R. massiliae*), **11** cas d'African tick-bite fever (*R. africae*), **4** cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis (*R. sibirica mongolitimonae*), **1** cas de typhus murin (*R. typhi*), **2** cas de fièvre boutonneuse à puce (*R. felis*), **2** cas de typhus des broussailles (*Orientia tsutsugamushi*) et **3** cas de dont l'espèce causale n'a pas été identifiée.

Au cours de l'année 2019, le nombre de cas d'infections à *Bartonella* a diminué par rapport à 2018, avec **100** patients (-26%), dont **83** maladies des griffes du chat, **13** endocardites et **4** autres formes. Par rapport à 2018, le nombre de diagnostics de maladie des griffes du chat (**83** vs 117, -29.0%) a diminué alors que le nombre de diagnostics d'endocardites est resté stable (**13** vs 12, +8.3%).

Au cours de l'année 2019, le CNR a également passé une convention de coopération scientifique avec le laboratoire national de référence de la fièvre Q (ANSES, Sofia-Antipolis), formalisant ainsi la collaboration ancienne entre les deux laboratoires, et a entamé une collaboration scientifique avec l'INRA au travers du projet Expaircox porté par le Dr Elsa Jourdain.

3.1. Description du réseau 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. LARTIGUE) et du CHG d'Aix en Provence (Dr. BRIEU) ainsi qu'à l'étranger (Russie, Slovaquie, Espagne, Suisse, Taiwan...).

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

3.1.1. 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. Le Pr Parola a créé EuroTravNet qui est actuellement dirigé par le Dr Philippe Gautret. 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 proposé aux 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).

3.1.2. Coopérations institutionnelles

Le CNR collabore étroitement avec l'ESCCAR (European Society for Chlamydioses, Coxiellosis, Anaplasmosis, Rickettsioses and other arthropod-borne intracellular bacteria) depuis sa création par le Pr Raoult, 1^{er} Président de l'ESCAR. En 2016 et 2017, le Pr Fournier a été président de l'ESCCAR. En 2017, le Pr Fournier a organisé à Marseille, dans les locaux de l'IHU Méditerranée-Infection le congrès joint de l'ESCCAR et de l'American Society for Rickettsiology du 19 au 21 juin. 1).

L'ESCCAR réunit les trois Centres Collaborateurs OMS Européens (Marseille, Moscou, Bratislava).

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

- Argentine : M. Prieto – Réseau national de surveillance des rickettsioses
- Belgique : M. Hing - CNR belge des Rickettsies
- Danemark : B. Jensen – CNR danois des Rickettsies
- Suède : S. Vene – Stockholm
- Suisse : A. Dumoulin – Sion
- USA : C. Paddock – CDC

3.1.3. Collaborations avec les pays étrangers

Le CNR a noué des collaborations avec de nombreuses équipes au tour du monde. De nombreux échanges de chercheurs ont notamment été réalisés. Des coopérations spécifiques dans le domaine du diagnostic des nouvelles maladies infectieuses ont été conduites avec les institutions suivantes :

- Shanghai 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-Zélande)
- Hôpital d'Oslo (Norvège)

Les collaborateurs étrangers du CNR comportent notamment :

Pays	Correspondant	Ville
Europe		
Belgique	Dr Monny Hing	Bruxelles
Espagne	Pr Jose Oteo	Logrono
Grande Bretagne	Pr Richard Birtles	Manchester
Grèce	Pr Emmanouil Angelakis	Athènes
	Pr Achilleas Gikas	Heraklion
Italie	Dr Laura Franzin	Turin
Norvège	Pr Mogens Jensenius	Oslo
Portugal	Dr Anna Santos	Lisbonne
	Dr Rita de Sousa	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
	Pr Najet Mouffok	Oran
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
	Pr John Stenos	Geelong
Amériques		
Canada	Pr Thomas J. Marrie	Edmonton
Saint Kitts/Nevis	Pr Patrick Kelly	Basseterre
USA	Dr Christopher Paddock	Atlanta
	Dr Gregory Dasch	Atlanta
Guyane	Dr Didier Musso	Cayenne

3.1.4. 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. En 2019, le CNR et le LNR ont poursuivi leur collaboration sur l'analyse du pangéome de *Coxiella burnetii*.

3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1. 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.

3.2.2. Diagnostic de la fièvre Q

En 2019, 15265 échantillons de sérum provenant de 12228 patients ont été testés au CNR pour la présence d'anticorps contre *C. burnetii*, (contre 14118 prélèvements de 11492 patients en 2018) soit +8.1%. De plus, nous avons reçu 8656 échantillons divers (sang, biopsies ganglionnaires, valves cardiaques, biopsies vasculaires, osseuses, ...) de 5062 patients (contre 6687 échantillons de 4914 patients en 2018, +29.4%) pour diagnostic moléculaire et culture.

A. Diagnostic sérologique

Au total, **1040** échantillons de sérum (**482 patients**) se sont révélés positifs en IgG ($\geq 1:100$) et/ou IgM ($\geq 1:50$). **Cent soixante-six** nouveaux cas de fièvre Q aiguë ont été diagnostiqués en 2019 contre 181 (-8.3%) en 2018, et **83** nouveaux cas de fièvre Q persistante focalisée contre **65** (+27.7%) en 2018. Enfin, **233** patients présentaient une cicatrice sérologique de fièvre Q ancienne ou un profil de fièvre Q persistante focalisée diagnostiquée avant 2018.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Soixante-dix-huit prélèvements provenant de **71** patients ont fait l'objet d'une détection de *C. burnetii* positive par détection moléculaire.

C. Diagnostic par culture

En outre, **17** souches de *Coxiella burnetii* ont été isolées en culture cellulaire de valves cardiaques (8) de biopsies d'anévrismes de l'aorte (5), de biopsies ostéo-articulaires (2) et de sang (2).

D. Fièvres Q aiguës

Le nombre de patients atteints de fièvre Q aiguë en 2019 et pour lesquels le CNR a reçu des prélèvements était de **166**, répartis en **128** patients en France métropolitaine, **30** patients en Guyane française, **1** patient à la Réunion, **5** patients en Italie, **1** au Sénégal et **1** au Sri Lanka. L'incidence de la fièvre Q aiguë en France (métropole et départements d'Outre Mer) calculée à partir des diagnostics obtenus au CNR en 2019 est de **0.26** pour 100.000 personnes, en légère baisse par rapport à 2018 (0.28). Ce taux d'incidence est un taux minimum qui sous-estime la réalité puisque la maladie n'est pas à déclaration obligatoire. 2019 a été marquée par la survenue d'une épidémie dans le lycée agricole d'Oloron-Sainte-Marie dans les Pyrénées Atlantiques. Parmi les 166 patients atteints de fièvre Q aiguë, **121 (72.9%)** étaient de sexe masculin (sex ratio M/F 2.68). L'âge moyen des patients atteints de fièvre Q était de **52.6 +/- 16.8** ans. Le plus jeune patient atteint de fièvre Q aiguë avait 8 ans, et le plus âgé 89 ans. **Quatre-vingt-treize** des 166 patients atteints de fièvre Q aiguë présentaient une hépatite fébrile (56%), **38** une fièvre isolée (22.9%), **29** une pneumonie (17.4%), **2** une arthrite (1.2%), **1** une endocardite aiguë (0.6%), **1** une péricardite (0.6%), **1** une pneumonie et une ostéite (0.6%), **1** une méningite (0.6%), **1** une méningoencéphalite (0.6%) (Tableau 3).

Tableau 3 : Données démographiques des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués au CNR en 2019

Forme Clinique	Nombre	Age moyen +/- écart-type	Sex ratio M/F
Hépatite	93	52.0 +/- 15.0	4.1
Fièvre isolée	38	53.8 +/- 17.9	2.4
Pneumonie	29	51.4 +/- 16.0	1.4
Athrite	2	8, 35	1/1
Endocardite aiguë	1	56	1/0
Péricardite	1	61	1/0
Ostéite + pneumonie	1	57	1/0
Méningite	1	38	0/1

La répartition temporelle des cas métropolitains de fièvre Q aiguë en fonction du mois du diagnostic pour 2019 montre un profil similaire à 2018, avec un pic d'avril à juillet comme les années précédentes (62.0%) (Figure 1). Cette répartition diffère de celles des années 2013 à 2017 où un pic en janvier avait été enregistré. La répartition géographique des cas métropolitains de fièvre Q en 2019 est présentée dans la Figure 2. La majorité des nouveaux cas de fièvre Q aiguë (41.2%) a été diagnostiquée dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA), suivie par les régions Nouvelle Aquitaine (15.0%), Auvergne-Rhône-Alpes (14.3%) et Occitanie (9.5%). Quatre-vingt-deux des patients ayant contracté la fièvre Q en métropole présentaient une hépatite (66.7%), **30** une fièvre isolée (24.3%), **7** une pneumonie (5.7%), **2** une arthrite (1.6%), **1** une endocardite aiguë (0.8%), **1** une péricardite (0.8%), **1** une méningite (0.8%), **1** une méningoencéphalite (0.8%).

Outre-mer, la Guyane est la région française où la fièvre Q a la plus forte incidence, avec **30** nouveaux cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués en 2019 (Figure 3), soit une incidence pour 100.000 habitants de 11.5, en légère hausse par rapport à l'année 2019 (10.4). Au plan clinique, la fièvre Q en Guyane s'est manifestée en 2019 en majorité par une pneumonie interstitielle fébrile (21 patients, 70.0%), suivie de fièvre isolée (6 patients, 20.0%), hépatite (2 patients, 6.7%) et pneumonie + ostéite (1 patient, 3.3%), ce qui diffère significativement à nouveau de la fièvre Q aiguë en métropole ($p < 10^{-2}$). De plus, un cas d'infection vasculaire a été diagnostiqué en Guyane en 2019. En outre, le CNR a reçu en 2019 des prélèvements de sérum pour 26 patients suivis pour fièvre Q ayant été diagnostiquée au cours des années précédentes, dont 20 patients ayant développé une fièvre Q aiguë et 6 une fièvre Q chronique.

Enfin, le CNR a diagnostiqué cinq cas de fièvre Q aiguë en Italie, un à la Réunion, un au Sénégal et un au Sri Lanka.

Figure 1. Répartition annuelle des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués par le CNR en 2019 en France métropolitaine

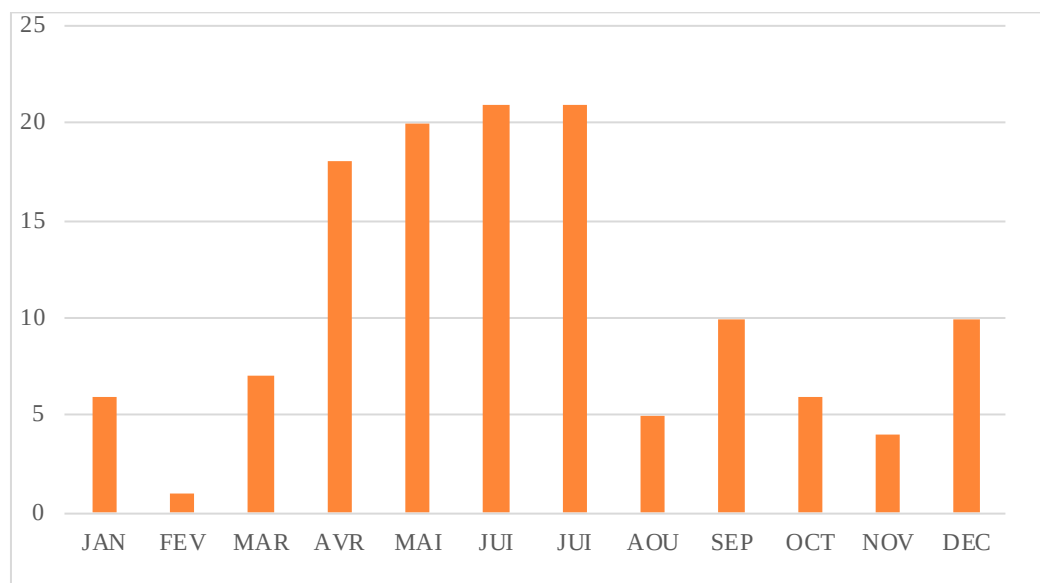


Figure 2. Répartition géographique des cas métropolitains de fièvre Q diagnostiqués par le CNR en France métropolitaine en 2019

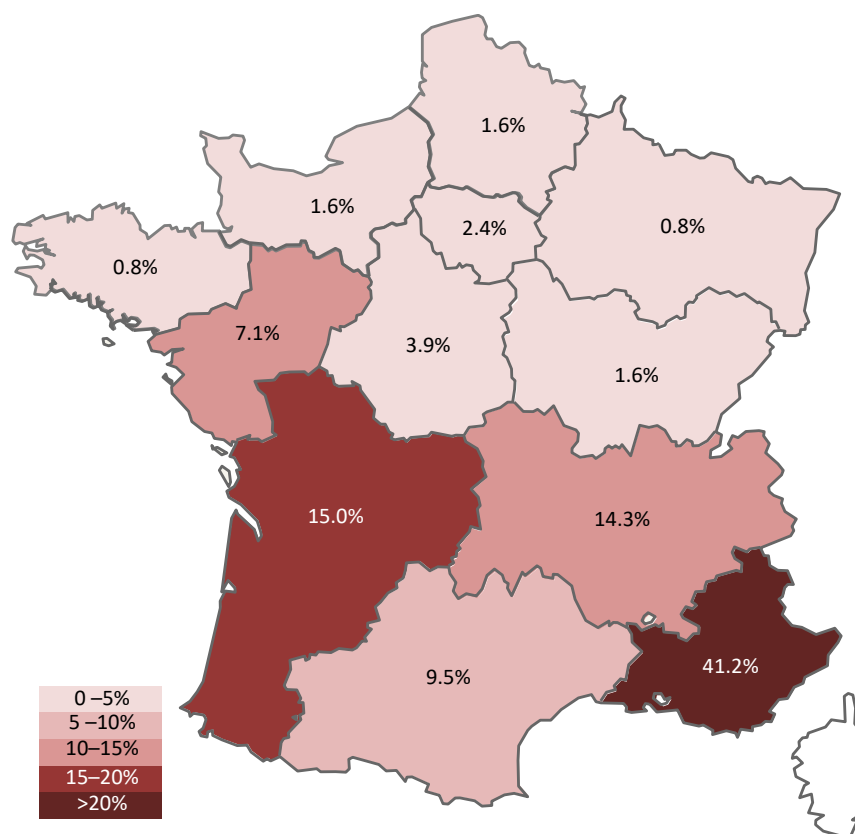
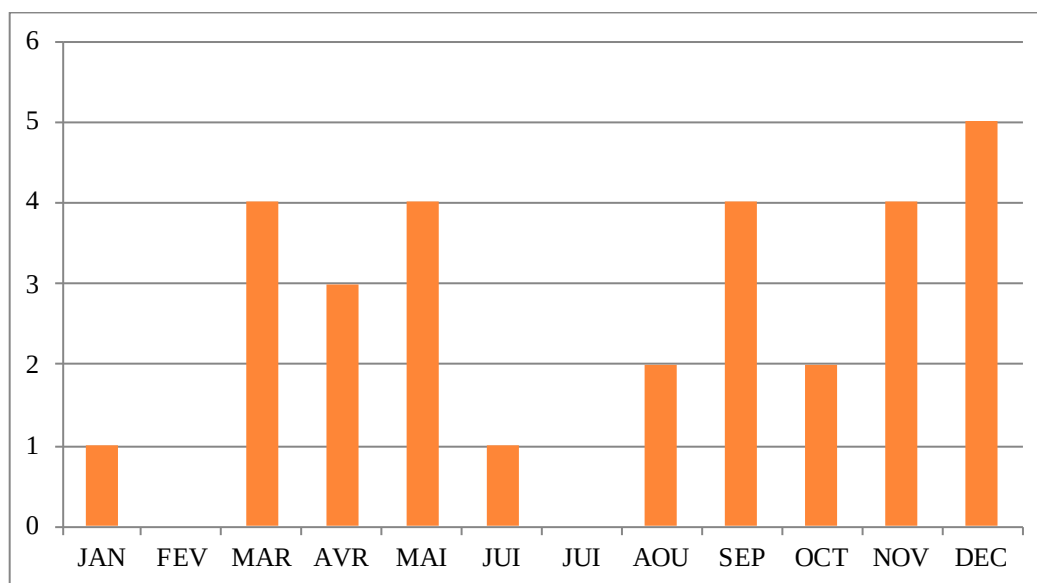


Figure 3. Répartition annuelle des cas de fièvre Q aiguë diagnostiqués par le CNR en 2019 en Guyane française



E. Epidémies de fièvre Q aiguë en France en 2019

En 2019, le CNR a été sollicité par Santé Publique France (Dr Alexandra Mailles) pour participer à l'investigation d'une suspicion de cas groupés de fièvre Q aiguë au sein du lycée agricole d'Oloron-Sainte-Marie dans les Pyrénées Atlantiques, en région Nouvelle Aquitaine. Cette alerte faisait suite à la survenue d'avortements dans un troupeau de 300 brebis, dont l'investigation vétérinaire avait démontré la causalité de *Coxiella burnetii*. L'équipe du LNR de la fièvre Q (Dr Elodie Rousset) a démontré le fort taux de contamination de l'environnement par la bactérie. A partir de mi-janvier 2019, trois étudiants du lycée ont développé des symptômes compatibles avec une fièvre Q aiguë. Au total, 12 personnes ont été suspectes de fièvre Q de janvier à avril 2019 dans le lycée d'Oloron-Sainte-Marie. Parmi ceux-ci, l'investigation de l'ARS de Nouvelle Aquitaine a considéré trois cas comme probables et un comme possible. Le CNR a reçu de échantillons de sérum pour sept des 12 patients, et a pu confirmer un cas par sérologie et PCR. Le lycée a été réouvert aux étudiants en septembre 2019. Aucun nouveau cas n'a été signalé au CNR.

F. Formes persistantes focalisées d'infections à *C. burnetii*

Quatre-vingt-trois nouveaux cas d'infection persistante focalisée à *C. burnetii* (fièvre Q chronique) ont été diagnostiqués par le CNR en 2019 contre **47** en 2018 (+76.6%). Parmi ces patients, le sex ratio H/F était de 4.18 (67/16) et l'âge moyen était de 65.5 +/- 19.1 ans. Les infections focales à *C. burnetii* se répartissaient selon les formes suivantes : endocardites (N = 47, 56.6%), infections vasculaires (N = 28, 33.7%), infections ostéo-articulaires (N = 4, 4.8%) 1 pseudo-tumeur pulmonaire (1.2%) et une méningite (1.2%). Les patients

atteints d'infections vasculaires présentaient un âge plus élevé que ceux présentant une endocardite (68.9 +/- 16.8 ans vs 69.0 +/- 8.0 ans). Concernant l'origine des patients présentant une forme persistante focalisée de fièvre Q, la région PACA est première (12 endocardites et 4 infections vasculaires), suivie de Nouvelle Aquitaine (6 IV, 4 EI, 2 infections ostéo-articulaires, 1 pseudo-tumeur pulmonaire, 1 méningite), Occitanie (10 EI et 3 IV), Auvergne-Rhône-Alpes (4 EI et 3 IV), Centre-Val de Loire (4 EI, 1 IV et 1 infection ostéo-articulaire), Pays de la Loire (1 EI, 2 IV et 1 infection ostéo-articulaire), Hauts de France (2 EI et 2 IV), Bretagne (3 EI), île de France (1 EI et 1 IV), Grand Est (1 EI et 1 IV) et Bourgogne-Franche Comté (1 IV). En dehors de la France métropolitaine, 1 endocardite a été diagnostiquée en Guyane française, 2 EI au Portugal 1 infection ostéo-articulaire en Israël, 1 IV en Belgique, 1 IV en Grande Bretagne, 1 EI en Inde et 1 EI en Italie.

3.2.3. Diagnostic des Rickettsioses

En 2019, **42** cas de rickettsioses ont été diagnostiqués au CNR contre 62 en 2018 (-32%).

A. Diagnostic sérologique

Parmi les **12228** patients testés en 2019, un diagnostic de rickettsiose a été porté chez **42** patients en (vs 62 en 2018, -32%) (Figure 4). Ces diagnostics incluent les diagnostics suivants : **13 cas de Scalp Eschar and Neck Lymph-Adenopathy after Tick Bite** (SENLAT, *R. raoultii* et *R. slovaca*), **6 cas de fièvre boutonneuse méditerranéenne** (FBM, *Rickettsia conorii* et *R. massiliae*), **11 cas d'African tick-bite fever** (ATBF, *R. africae*), **4 cas de Lymphangitis Associated Rickettsiosis** (LAR, *R. sibirica mongolitimonae*), **2 cas de typhus murin** (TM, *R. typhi*), **2 cas de fièvre boutonneuse à puce** (FB, *R. felis*), **1 cas de typhus des broussailles** (TB, *Orientia tsutsugamushi*) et **3 cas** dont l'espèce causale n'a pas été identifiée. Les caractéristiques des patients infectés par type d'infection ainsi que le lieu géographique de la piqûre lorsqu'il était connu figurent dans le Tableau 4. La distribution temporelle des cas de rickettsioses est montrée dans la Figure 4.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Mille neuf cent Trente-cinq prélèvements de 1347 patients ont fait l'objet d'un diagnostic par biologie moléculaire. Quatre-vingt-six (4.8%) de ces prélèvements se sont révélés positifs et ont permis de contribuer au diagnostic de rickettsioses pour 23 des 42 patients positifs. La nature des prélèvements les plus fréquemment positifs étaient les écouvillons d'escarre (33%), les biopsies cutanées (31%) et les échantillons de sérum (22%).

C. Diagnostic par culture

En outre, 9 souches de rickettsies ont été isolées en culture cellulaire de tiques, incluant 5 souches de *R. slovaca*, 2 de *R. conorii*, 1 de *R. africae* et 1 de *R. raoultii*.

D. Répartition des cas de rickettsioses diagnostiqués

Les 13 patients présentant un tableau de SENLAT sont issus des régions suivantes : Bourgogne-Franche Comté, Pays de la Loire, Occitanie, PACA, Corse, ainsi qu'un cas en Guadeloupe, et la maladie a été contractée de janvier à août (Figure 4, Tableau 4). Sur les 11 cas d'ATBF, 8 ont été contractés en Afrique du Sud lors de visites de parcs animaliers d'Afrique du Sud, où la maladie est endémique et transmise par les tiques du genre *Amblyomma*. Les autres cas d'ATBF proviennent du Mozambique, du Sénégal et de Tanzanie. Les 6 cas de FBM sont survenus en totalité de mai à septembre, dans le pourtour méditerranéen qui est la zone d'endémie de cette rickettsiose associée à la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus*. Quatre cas ont été contractés en France (3 en PACA et 1 en Occitanie), 1 au Portugal et 1 au Maroc. Les 3 patients présentant une LAR ont été infectés en région Nouvelle Aquitaine ou Occitanie. En France, les cas sont survenus entre juin et septembre. Le patient atteint de typhus murin revenait du Laos. Les 2 cas de fièvre boutonneuse à puce ont été contractés en région Hauts de France et en Algérie. Les 2 cas de typhus des broussailles ont été contractés en Indonésie et un pays non précisé d'Asie. Les 3 cas de rickettsiose indéterminée ont été contractés en Auvergne-Rhône-Alpes, Centre-Val de Loire et PACA.

Figure 4. Répartition mensuelle des cas de rickettsioses diagnostiqués en 2019

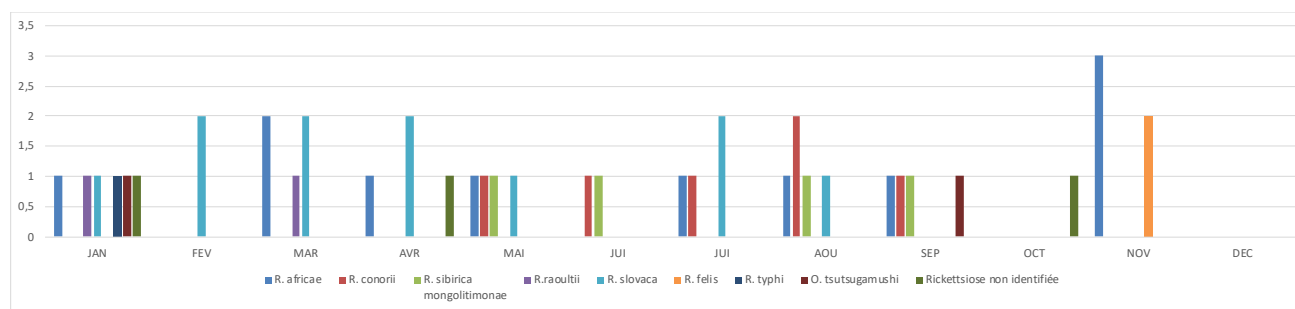


Tableau 4. Caractéristiques des patients chez lesquels un diagnostic de rickettsiose a été posé en 2019 (N = 42)

Infection	Sex ratio H/F	Age moyen, déviation standard	Lieu de pique
SENLAT	3/10	45.4 +/- 24.6	Bourgogne, Corse, Occitanie, PACA, Pays de la Loire, Guadeloupe
Fièvre boutonneuse méditerranéenne	4/2	50.1 +/- 22.1	PACA, Occitanie, Maroc, Portugal
African tick-bite fever	9/2	56.5 +/- 18.7	Afrique du Sud, Mozambique, Sénégal, Tanzanie
Lymphangitis Associated Rickettsiosis	3/1	60.8 +/- 11.5	Nouvelle Aquitaine, Occitanie
Typhus murin	1/0	63	Laos
Fièvre boutonneuse à puces	0/2	63, 64	Algérie, Hauts de France
Typhus des broussailles	2/0	37, 39	Indonésie, Asie
Rickettsiose indéterminée	2/1	58.8 +/- 11.9	Auvergne-Rhône-Alpes, Centre-Val de Loire, PACA

3.2.4. Diagnostic des Bartonelloses

En 2019, **100** cas d'infections à *Bartonella* sp. ont été diagnostiqués au CNR, contre 135 en 2018 (-26%). **Quatre-vingt-trois** de ces patients étaient atteints de maladie des griffes du chat (MGC). Un diagnostic d'endocardite a été porté chez **13** patients : à *B. henselae* (8 patients) ou *B. quintana* (5 patients). **Cinq** autres formes ont été observées : **un** cas de **bactériémie chronique** à *B. henselae*, **un** cas de **bactériémie chronique** à *B. quintana*, et **un** cas de **péliose hépatique** et **deux** cas d'angiomatose bacillaire à *B. henselae*.

A. Diagnostic sérologique

Trente échantillons de sérums (pour 25 patients) se sont révélés positifs (taux d'IgG $\geq 1:100$) en sérologie. Les sérums positifs étaient ceux de patients atteints de maladie des griffes du chat ou d'endocardite.

B. Diagnostic par biologie moléculaire

Cent quarante-six des 2996 prélèvements adressés pour diagnostic moléculaire, pour **89** patients, se sont révélés positifs.

C. Diagnostic par culture

Aucune souche de *Bartonella* n'a été cultivée en 2019.

D. Maladie des griffes du chat

Un diagnostic de maladie des griffes du chat (MGC) a été porté chez 83 patients (Figure 5). Les patients atteints de MGC étaient majoritairement des hommes (55.4%) d'un âge moyen de 35.9 +/- 19.3 ans (contre 37.3 +/-18 pour les femmes). Cette population était plus jeune que les autres patients atteints d'autres formes de bartonelloses (Tableau 5). La figure 5 montre la répartition des cas de MGC en fonction du mois de diagnostic avec une forte saisonnalité, déjà observée au cours des années précédentes : 73.5% des cas sont diagnostiqués d'octobre à avril. La répartition géographique des cas de MGC (Figure 6) montrait une prédominance des cas dans l'ouest de la France. Il est à noter que, pour la première fois depuis 2013, c'est la région Pays de la Loire qui arrivait en tête avec 19.2 %, suivie par les régions PACA (16.8%), Nouvelle Aquitaine (15.6%) et Occitanie (12.0%). A la différence de la fièvre Q et des rickettsioses pour lesquelles la région PACA est surreprésentée, notamment en cause du biais que constitue la présence du CNR, les bartonelloses semblent bien, et de façon constante dans le temps, plus fréquentes dans l'ouest de la France.

Figure 5. Répartition temporelle des cas de maladies des griffes du chat en 2019 par mois de diagnostic

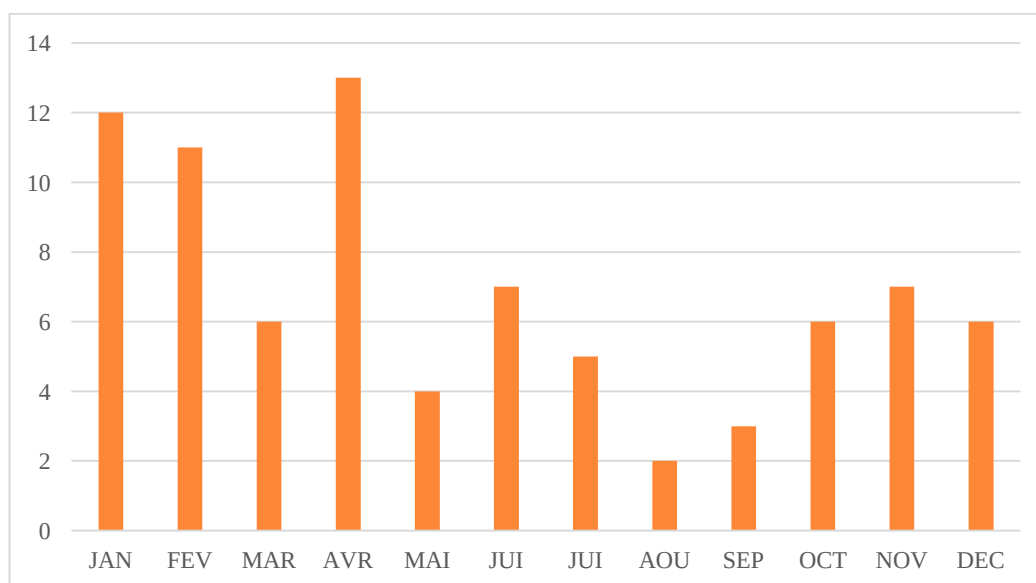
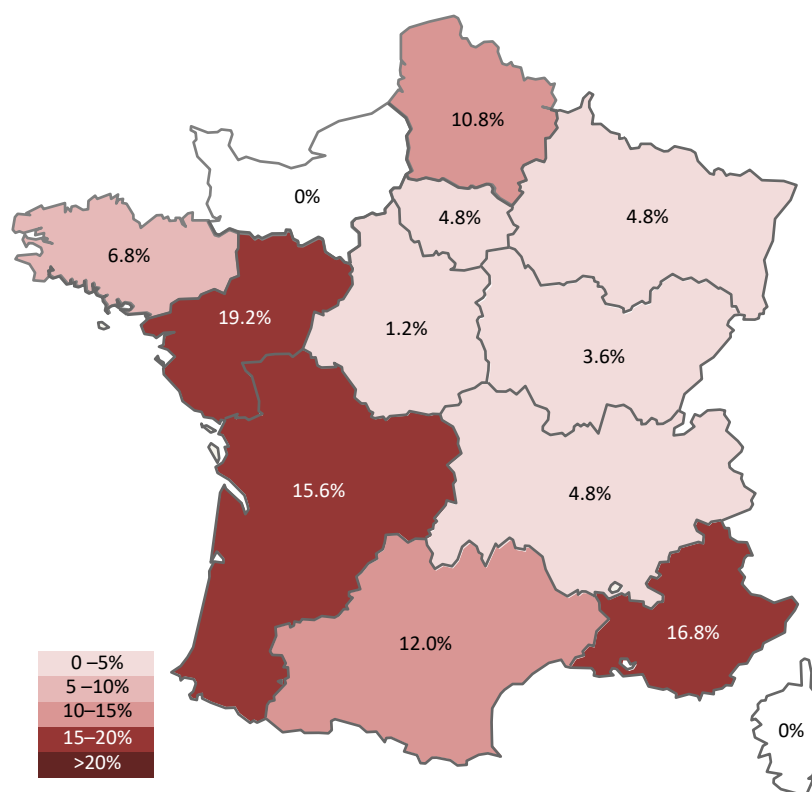


Figure 6. Répartition géographique des cas de maladie des griffes du chat diagnostiqués par le CNR en France en 2019



E. Autres bartonelloses

Le Tableau 5 montre les autres diagnostics de bartonelloses établis par le CNR ainsi que les caractéristiques des patients. Un diagnostic d'endocardite à *B. henselae* a été porté chez 8 patients, d'endocardite à *B. quintana* chez 5 patients, de bactériémie chronique à *B. henselae* chez 1 patient, de bactériémie chronique à *B. quintana* chez 1 patient SDF, et d'1 péliose hépatique et 2 angiomatoses bacillaires à *B. henselae* chez des patients immunodéprimés.

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	Région d'origine
Endocardite à <i>B. henselae</i>	8	6/2	60.0 +/- 20.6	Auvergne-Rhône-Alpes, Corse, Grand Est, Nouvelle Aquitaine, PACA, Nouvelle Calédonie, Grande-Bretagne
Endocardite à <i>B. quintana</i>	5	5/0	53.2 +/- 21.6	Auvergne-Rhône-Alpes, Hauts de France, PACA, Mali, Pays Bas
Bactériémie à <i>B. henselae</i>	1	1/0	78	Occitanie
Bactériémie à <i>B. quintana</i>	1	1/0	46	Centre-Val de Loire
Péliose hépatique	1	1/0	47	Bourgogne-Franche Comté
Angiomatose bacillaire à <i>B.henselae</i>	2	0/2	25, 71	Bourgogne-Franche Comté, Nouvelle Aquitaine

3.2.5. 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.

3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes 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.

3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

4. ALERTE

En 2019 le CNR a été associé à l'investigation d'une épidémie de fièvre Q dans le lycée agricole d'Oloron-Sainte-Marie.

5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé

L'IHU Méditerranée Infection organise chaque semaine un séminaire de microbiologie clinique au cours duquel les titulaires du CNR et les internes en formation présentent des cas cliniques et la bibliographie qui s'y rapporte. Ces séminaires sont ouverts aux professionnels de santé, hors CHU qui souhaitent y participer. Les infectiologues des CHP Saint-Joseph et Clairval, et de l'HIA Laveran, Marseille, assistent sur un rythme régulier à ces séminaires.

Chaque semaine un staff organisé le lundi matin, avec l'ensemble des personnels concernés, permet de présenter tous les diagnostics faits par le CNR. A l'issue de cette réunion, les professionnels de santé ayant adressé des échantillons qui se sont révélés positifs sont informés par téléphone ou courriel.

En 2019, le CNR a reçu 8 stagiaires venus se former aux techniques de sérologie et de diagnostic moléculaire en lien avec les thématiques du CNR.

Tous les appels ou courriels sont réceptionnés par le secrétariat du CNR et redirigé vers les médecins seniors titulaires. En moyenne, le CNR reçoit du lundi au vendredi 10 appels et autant de courriels en lien avec ses thématiques de recherche.

Présentation du Site Internet du CNR

Le Site Internet du CNR, dont l'adresse est la suivante <https://www.mediterranee-infection.com/diagnostic/les-centres-nationaux-de-reference-cnr/cnr-rickettsioses/> 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** pour lesquelles nous sommes centre de **référence**. 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 au catalogue des souches détenues par le CNR
- Aux rapports d'activité du CNR

5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

En 2019 le CNR n'a pas été sollicité par le Ministère de la Santé, le HCSP, la HAS ou l'OMS.

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

6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1. Fièvre Q

En 2019, les chercheurs du CNR ont décrit l'existence des fièvres Q aiguës se présentant comme des endocardites (3), et les caractéristiques de la souche de *Coxiella burnetii* endémique en Guyane (4). Nous avons également développé une méthode pour tester l'avidité des IgG anti-*Coxiella burnetii* pour distinguer les infections récentes des anticorps séquellaires (2). Les patients ayant une infection récente ont des IgG de faible avidité. Nous avons également démontré que les patients atteints de fièvre Q présentaient une réduction des progéniteurs mastocytaires circulants mais une élévation de la tryptase sérique (6). Dans le cadre d'une collaboration avec les infectiologues du Prince Sultan Military Medical City de Riyadh en Arabie Saoudite, nous avons identifié *Coxiella burnetii* comme responsable de 8.1% des endocardites dans ce centre hospitalier (1). Enfin, nous avons publié une revue sur la fièvre Q (5).

6.1.2. *Rickettsia*

En 2019, l'équipe du CNR a mis au point l'identification des espèces de puces, y compris préservées en alcool, par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS (17). Nous avons également mis au point en collaboration avec le CNR slovaque des *Rickettsia*, une méthode de coloration des filaments d'actine permettant une détection améliorée des rickettsies dans les cellules (9).

Le CNR a décrit une nouvelle présentation clinique de SENLAT à *R. slovaca* chez un patient ayant développé une cellulite de la face (13), et participé, en collaboration avec le Quang Nam General Hospital (Quang Nam, Vietnam), à l'identification d'*Orientia tsutsugamushi* et *R. typhi* comme agents de fièvre d'étiologie inconnue dans ce pays (14).

Par ailleurs, nous avons identifié un nouveau clade de poux du corps humain, le clone F, parmi des poux prélevés sur les membres d'une tribu Wayampi en Guyane française (8), et avons en collaboration avec le CNR des *Borrelia* détecté des pathogènes potentiels chez 70% de 50 *Ixodes ricinus* collectés en Alsace appartenant aux genres *Anaplasma*, *Babesia*, *Bartonella*, *Borrelia* et *Rickettsia* (15).

Les membres du CNR ont également écrit une revue sur les formes neurologiques de rickettsioses (16), et participé à la rédaction de recommandations nationales sur le diagnostic et la prise en charge de la maladie de Lyme et autres maladies transmises par les tiques (11, 12). Enfin, nous avons publié une analyse génomique des *Rickettsia* montrant l'évolution paradoxale de ces bactéries dans laquelle les espèces les plus virulentes ont les génomes les plus dégradés et les plus petits (10).

6.1.3. *Bartonella*

En 2019, l'équipe du CNR a mis au point l'utilisation de la spectrométrie de masse par MALDI-TOF-MS pour l'identification des punaises de lit *Cimex lectularius* et dans le même temps de *B. quintana* et *B. henselae* (19).

Par ailleurs, le CNR a décrit une nouvelle espèce de *Bartonella*, *B. massiliensis*, isolée de tiques molles *Ornithodoros sonrai* du Sénégal (20).

Enfin, nous avons détecté des *Bartonella* (*B. chomelii* et *B. melophagi*) dans 126 poux de mouton (*Melophagus ovinus*) d'Algérien (18).

6.2 – Liste des publications et communications de l'année 2019, ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1. Fièvre Q

- 1) Elzein FE, Alsherbeen N, Alnajashi K, Alsufyani E, Akhtar MY, Albalawi R, Albarrag AM, Kaabia N, Mehdi S, Alzahrani A, **Raoult D**. Ten-year experience of **Q fever endocarditis** in a tertiary cardiac center in Saudi Arabia. *Int J Infect Dis*. 2019 Nov;88:21-26. doi: 10.1016/j.ijid.2019.07.035. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31382048.
- 2) Luciani L, L'Ollivier C, Million M, Amphoux B, Edouard S, **Raoult D**. Introduction to Measurement of Avidity of Anti-**Coxiella burnetii** IgG in Diagnosis of Q Fever. *J Clin Microbiol*. 2019 Sep 24;57(10):e00539-19. doi: 10.1128/JCM.00539-19. PMID: 31366688; PMCID: PMC6760940.
- 3) Melenotte C, Epelboin L, Million M, Hubert S, Monsec T, Djossou F, Mège JL, Habib G, **Raoult D**. **Acute Q Fever Endocarditis: A Paradigm Shift Following the Systematic Use of Transthoracic Echocardiography During Acute Q Fever**. *Clin Infect Dis*. 2019 Nov 13;69(11):1987-1995. doi: 10.1093/cid/ciz120. PMID: 30785186.
- 4) Melenotte C, Caputo A, Bechah Y, Lepidi H, Terras J, Kowalczywska M, Di Pinto F, Nappez C, **Raoult D**, Brégeon F. The hypervirulent **Coxiella burnetii** Guiana strain compared in silico, in vitro and in vivo to the Nine Mile and the German strain. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Sep;25(9):1155.e1-1155.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2018.12.039. Epub 2019 Jan 6. PMID: 30625413.
- 5) Melenotte C, Million M, **Raoult D**. New insights in **Coxiella burnetii** infection: diagnosis and therapeutic update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020 Jan;18(1):75-86. doi: 10.1080/14787210.2020.1699055. Epub 2019 Dec 6. PMID: 31782315.
- 6) Mezouar S, Morel V, Leveille L, Resseguier N, Chartier C, **Raoult D**, Mege JL, Vitte J. Progenitor mast cells and tryptase **in Q fever**. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019 Jun;64:159-162. doi: 10.1016/j.cimid.2019.03.011. Epub 2019 Mar 20. PMID: 31174692.
- 7) Million M, **Raoult D**. Relevance of Medical Big Data Analysis Depends on Clinical Accuracy: **The Q Fever Paradigm**. *Clin Infect Dis*. 2019 Jan 1;68(1):169-170. doi: 10.1093/cid/ciy533. PMID: 29985977.

6.2.2. Rickettsies

- 8) Amanzougaghene N, **Fenollar F**, Davoust B, Djossou F, Ashfaq M, Bitam I, **Raoult D**, Mediannikov O. Mitochondrial diversity and phylogeographic analysis of ***Pediculus humanus*** reveals a new Amazonian clade "F". *Infect Genet Evol.* 2019 Jun;70:1-8. doi: 10.1016/j.meegid.2019.02.006. Epub 2019 Feb 12. PMID: 30769089.
- 9) Danchenko M, Csaderova L, **Fournier PE**, Sekeyova Z. Optimized fixation of actin filaments for improved indirect immunofluorescence staining of ***rickettsiae***. *BMC Res Notes.* 2019 Oct 16;12(1):657. doi: 10.1186/s13104-019-4699-9. PMID: 31619275; PMCID: PMC6794859.
- 10) Diop A, Raoult D, **Fournier PE**. Paradoxical evolution of ***rickettsial*** **genomes**. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019 Feb;10(2):462-469. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.007. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30448253.
- 11) Jaulhac B, Saunier A, Caumes E, Bouiller K, Gehanno JF, Rabaud C, Perrot S, **Eldin C**, de Broucker T, Roblot F, Toubiana J, Sellal F, Vuillemet F, Sordet C, Fantin B, Lina G, Sobas C, Gocko X, Figoni J, Chirouze C, Hansmann Y, Hentgen V, Cathebras P, Dieudonné M, Picone O, Bodaghi B, Gangneux JP, Degeilh B, Partouche H, Lenormand C, Sotto A, Raffetin A, Monsuez JJ, Michel C, Boulanger N, Lemogne C, Tattevin P; endorsed by scientific societies. Lyme borreliosis and **other tick-borne diseases**. Guidelines from the French scientific societies (II). Biological diagnosis, treatment, persistent symptoms after documented or suspected Lyme borreliosis. *Med Mal Infect.* 2019 Aug;49(5):335-346.
- 12) Figoni J, Chirouze C, Hansmann Y, Lemogne C, Hentgen V, Saunier A, Bouiller K, Gehanno JF, Rabaud C, Perrot S, Caumes E, **Eldin C**, de Broucker T, Jaulhac B, Roblot F, Toubiana J, Sellal F, Vuillemet F, Sordet C, Fantin B, Lina G, Gocko X, Dieudonné M, Picone O, Bodaghi B, Gangneux JP, Degeilh B, Partouche H, Lenormand C, Sotto A, Raffetin A, Monsuez JJ, Michel C, Boulanger N, Cathebras P, Tattevin P; endorsed by scientific societies. Lyme borreliosis and **other tick-borne diseases**. Guidelines from the French Scientific Societies (I): **prevention, epidemiology, diagnosis**. *Med Mal Infect.* 2019 Aug;49(5):318-334. doi: 10.1016/j.medmal.2019.04.381. Epub 2019 May 13. PMID: 31097370.
- 13) Hocquart M, Drouet H, Levet P, **Raoult D**, **Parola P**, **Eldin C**. Cellulitis of the face associated with **SENLAT caused by Rickettsia slovaca** detected by qPCR on scalp eschar swab sample: An unusual case report and review of literature. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019 Aug;10(5):1142-1145. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.06.010. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31213411.
- 14) Le-Viet N, Le VN, Chung H, Phan DT, Phan QD, Cao TV, Abat C, **Raoult D**, **Parola P**. Prospective case-control analysis of the aetiologies of acute undifferentiated fever in

Vietnam. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):339-352. doi: 10.1080/22221751.2019.1580539. PMID: 30866787; PMCID: PMC6455186.

15) Nebbak A, Dahmana H, Almeras L, Raoult D, Boulanger N, Jaulhac B, Mediannikov O, **Parola P**. Co-infection of bacteria and protozoan parasites in ***Ixodes ricinus*** nymphs collected in the Alsace region, France. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019 Oct;10(6):101241. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.06.001. Epub 2019 Jun 8. PMID: 31279737.

16) Sekeyová Z, Danchenko M, Filipčík P, **Fournier PE**. **Rickettsial infections** of the central nervous system. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Aug 29;13(8):e0007469. doi: 10.1371/journal.pntd.0007469. PMID: 31465452; PMCID: PMC6715168.

17) Zurita A, Djeghar R, Callejón R, Cutillas C, **Parola P**, Laroche M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a useful tool for the rapid identification of **wild flea vectors** preserved in alcohol. *Med Vet Entomol.* 2019 Jun;33(2):185-194. doi: 10.1111/mve.12351. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30516832.

6.2.3. Bartonella

18) Boucheikhchoukh M, Mechouk N, Benakhla A, **Raoult D, Parola P**. Molecular evidence of bacteria in *Melophagus ovinus* sheep keds and *Hippobosca equina* forest flies collected from **sheep and horses in northeastern Algeria**. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2019 Aug;65:103-109. doi: 10.1016/j.cimid.2019.05.010. Epub 2019 May 10. PMID: 31300097.

19) El Hamzaoui B, Laroche M, **Parola P**. **Detection of Bartonella spp.** in *Cimex lectularius* by MALDI-TOF MS. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2019 Jun;64:130-137. doi: 10.1016/j.cimid.2019.03.001. Epub 2019 Mar 8. PMID: 31174687.

20) Medkour H, Lo CI, Anani H, **Fenollar F**, Mediannikov O. ***Bartonella massiliensis* sp. nov.**, a new bacterial species isolated from an ***Ornithodoros sonrai*** tick from Senegal. *New Microbes New Infect.* 2019 Aug 27;32:100596. doi: 10.1016/j.nmni.2019.100596. PMID: 31719993; PMCID: PMC6839013.

COMMUNICATIONS

Trois communications filmées portant sur les thématiques du CNR ont été présentées à l'IHU dans la cadre des staff de microbiologie destinés aux infectiologues et microbiologistes de la région de Marseille

18/06/2019: Cléa Melenotte : Quoi de neuf pour la fièvre Q ?

25/06/2019: Philippe Parola : Entomologie médicale à l'IHU Méditerranée infection

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX

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. En 2019, le CNR et le LNR ont poursuivi l'analyse du pangénome de *Coxiella burnetii*.

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES

8.1. Démarche qualité

Le CNR s'est doté d'un guide de bonne exécution des analyses (GBEA) pour toutes les activités de culture, sérologie et détection moléculaire du laboratoire. Les activités de sérologie du CNR ont fait l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2012) sous la référence 8-3446. Ces activités ont fait l'objet du 09 au 12 octobre 2018 d'une visite des experts COFRAC (rapport d'activités SH-10-0469-1 v00).

8.2. Activité de recherche en 2019 et 2020

Le CNR poursuivra sa collaboration scientifique avec le LNR de la fièvre Q sur l'analyse pangénomique de *Coxiella burnetii* en mettant l'accent sur la comparaison entre souches humaines et souches animales.

Le CNR poursuivra aussi les analyses pangénomiques des bactéries des genres *Rickettsia* et *Bartonella* débutées en 2018.

Une étude de séroprévalence de la fièvre Q dans la région de Niort, initialement prévue en 2018, sera réalisée en collaboration avec l'EFS (Dr Pierre Gallian) et l'INRA (Dr Elsa Jourdain) en 2020.

8.3. Activité d'expertise

En 2018, le CNR a entrepris de comparer sa méthode de sérologie par immunofluorescence indirecte avec deux kits sérologiques commercialisés pour le diagnostic de la fièvre Q (Vircell *Coxiella burnetii* I+II IFA IgG/IgM/IgA et Focus Q fever IgG). Après une première analyse en 2018, des tests complémentaires seront réalisés en 2020.

ANNEXES 2019

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

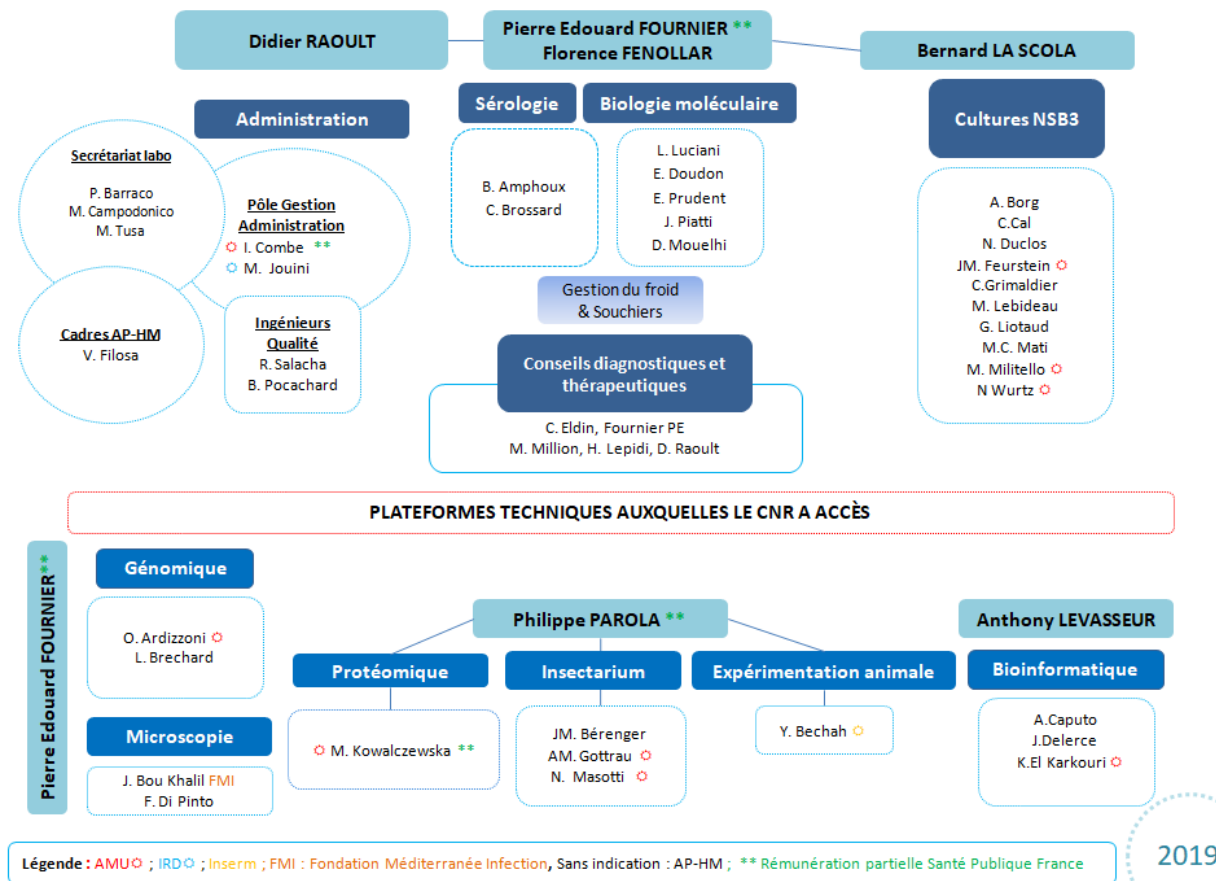
Le Centre National de Référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* (CNR), créé en 1985, a vu son agrément renouvelé par le ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé pour la période du 1^{er} janvier 2017 au 31 décembre 2021 (JORF n°0058 du 09-03-2017, texte n°20). Le CNR reçoit plus de **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

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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



1.3 L'équipe impliquée dans les activités du CNR

Enseignants chercheurs et chercheurs

Nom	Prénom	Tutelle	Fonction
ELDIN	Carole	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
FOURNIER	Pierre-Edouard	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur, Directeur
FENOLLAR	Florence	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
LA SCOLA	Bernard	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
LEPIDI	Hubert	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
LEVASSEUR	Anthony	AMU	Enseignant-Chercheur
LUCIANI	Lea	AMU	Enseignant-Chercheur
MILLION	Matthieu	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
PAROLA	Philippe	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur
RAOULT	Didier	AMU/AP-HM	Enseignant-Chercheur

Ingénieurs et équipe technique

Nom	Prénom	Tutelles	Fonction
AMPHOUX	Bernard	CHU MARSEILLE - APMH	Technicien Sérologie
ARDIZZONI	Olivia	AMU	Technicienne plateforme génomique
BECHAH	Yassina	INSERM	Ingénieur Recherche en expérimentation animale
BERENGER	Jean-Michel	CHU MARSEILLE - APMH	Technicien animalerie - insectarium
BORG	Audrey	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
BOU KHALIL	Jacques	FMI	Ingénieur Recherche Microscopie Electronique
BRECHARD	Ludvine	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur Plateforme génomique
BROSSARD	Catherine	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne Sérologie
CAL	Céline	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
CAPUTO	Aurélié	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur en Bioinformatique
DELERCE	Jérémy	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur en Bioinformatique
DI PINTO	Fabrizio	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur en microscopie électronique
DOUDON	Emilie	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
DUCLOS	Nathalie	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
EL KARKOURI	Khalid	AMU	Ingénieur Recherche en Bioinformatique

FEUERSTEIN	Jean-Marc	AMU	Technicien fonctionnement NSB3
GOTTRAU	Anne-Marie	AMU	Aide Technique en animalerie
GRIMALDIER	Clio	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
KOWALCZEWSKA	Malgo	AMU	Ingénieur Etudes en protéomique
LE BIDEAU	Marion	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
LIOTAUD	Gilles	CHU MARSEILLE - APMH	Technicien cultures cellulaires NSB3
MASOTTI	Noëlle	AMU	Aide Technique en animalerie /insectarium
MATI	Marie-Charlotte	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne cultures cellulaires NSB3
MILITELLO	Muriel	AMU	Ingénieur Etude en Techniques Biologiques NSB2/NSB3
MOUELHI	Dounia	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne en biologie moléculaire
PIATTI	Julie	CHU MARSEILLE - APMH	Technicienne en biologie moléculaire
POCACHARD	Bérangère	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur Qualité
PRUDENT	Elsa	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur plateforme
SALACHA	Richard	CHU MARSEILLE - APMH	Ingénieur Qualité
WURTZ	Nathalie	AMU	Ingénieur Responsable laboratoire NSB3

AMU : Aix-Marseille Université ; FMI : Fondation Méditerranée Infection ; IRD : Institut de Recherche et Développement ; AP-HM : Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille

Equipe administrative

Nom	Prénom	Tutelles	Fonction
BARRACO	Priscilla	CHU MARSEILLE - APMH	Secrétaire
COMBE	Isabelle	AMU	Cadre administrative recherche
FILOSA	Véronique	CHU MARSEILLE - APMH	Cadre laboratoires
JOUINI	Manel	IRD	Cadre gestionnaire recherche
PATTI	Gwendoline	CHU MARSEILLE - APMH	Secrétaire
TUSA	Marie	CHU MARSEILLE - APMH	Secrétaire

AMU : Aix-Marseille Université ; IRD : Institut de Recherche pour le Développement ; AP-HM : Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille

Pierre-Edouard FOURNIER, Bernard LA SCOLA, et Didier RAOULT possèdent une autorisation d'expérimentation animale permettant de conduire des recherches dans les deux animaleries A3 du laboratoire. Le Pr La Scola est habilité à la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous les références ADE-083212017-7 et ADE-083222017-8, respectivement).

1. 4. Locaux et équipements



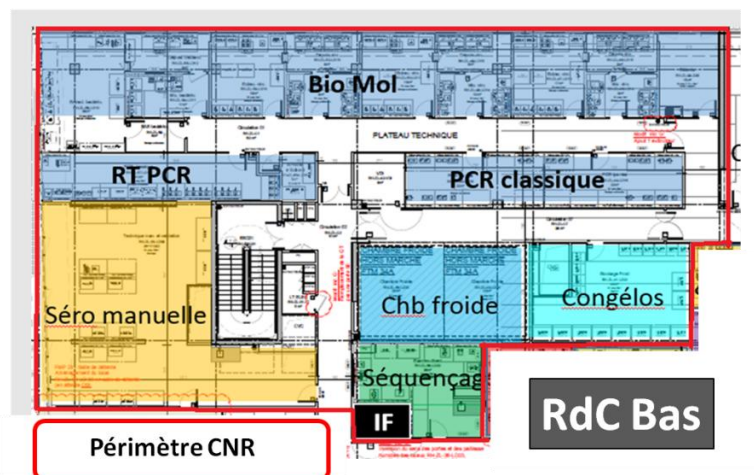
Depuis janvier 2017, le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella* est localisé dans les locaux de l'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée-Infection. Cet institut dédié à la prise en charge et à l'étude des maladies infectieuses comporte :

- Trois unités d'hospitalisation de maladies infectieuses (75 lits, dont 25 lits en niveau de sécurité biologique 3).
- Le laboratoire de diagnostic microbiologique (bactériologie, virologie, parasitologie) du CHU de Marseille.
- Quatre unités de recherche dont **MEPHI D-258** (Microbes Evolution Phylogénie et Infections) et **VITROME D-257** (Vecteurs – Infections Tropicales et Méditerranéennes) issues de l'ancienne UMR URMITE et validées par l'HCERES pour le contrat d'établissement 2018-2022. Et les UMR **UVE D-190** (Unité des Virus Emergents), et **1252-SESSTIM** (Sciences Economiques et Sociales de la Santé et Traitement de l'Information Médicale).
- Des plateformes de culturomique, génomique, microscopie électronique, protéomique, un insectarium, une biobanque et un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 de 1000 m² divisé en 4 modules de 250 m².
- Le CNR des Arbovirus et le CNR des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella*.
- CNR du Paludisme (Bruno Pradines)

Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR sont réalisées dans le laboratoire de diagnostic microbiologique de l'IHU Méditerranée-Infection (rez-de-chaussée haut), les activités de culture dans le module 2 du laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3, troisième étage).

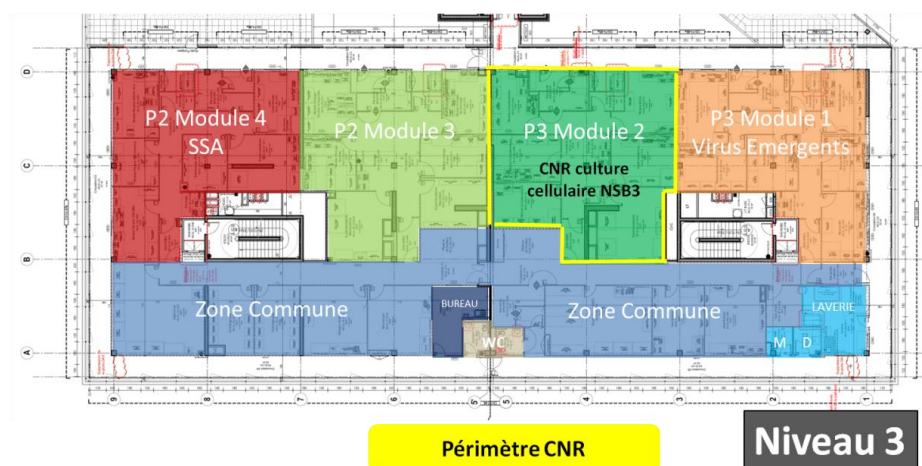
1. 5. Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR

Les activités de sérologie et détection moléculaire du CNR sont réalisées dans le laboratoire de diagnostic microbiologique de l'IHU Méditerranée-Infection (rez-de-chaussée haut).



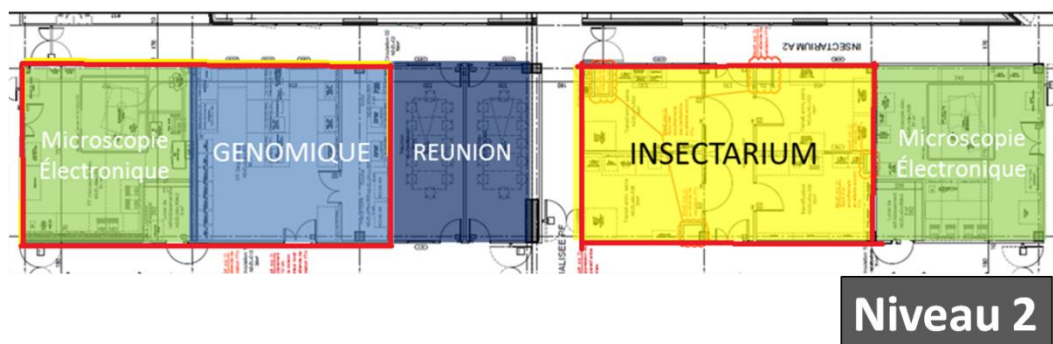
1.5.1. Les activités de culture du CNR

Les activités de culture du CNR sont réalisées dans le module 2 du laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3, troisième étage).



1.5.2. Les Plateformes

Les membres du CNR ont accès aux plateformes de microscopie électronique, génomique, et à l'insectarium de l'IHU (deuxième étage).



1.5.3. Les principaux équipements

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 Ion Torrent S5XL (Applied Biosystems)
- 4 séquenceurs à haut débit MiSeq (Illumina)
- 1 séquenceur à haut débit GridION (Oxford Nanopore)
- 2 séquenceurs 3500XL (Applied Biosystem)
- 10 Thermocyclers conventionnels (Applied biosystems, Eppendorf, Biometra)
- 10 thermocycleurs en temps réel LC480 (Roche)
- 10 extracteurs d'ADN EZ-One (QIAGEN)
- 5 broyeur Fastprep
- 1 bain sec
- 1 Hydroshear (GeneMachines)
- 7 hottes BIOCAP DNA (Bioblock)
- 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)
- 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. Microscopes 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)
- microscope électronique à balayage TM4000+ (Hitachi)

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)
- Spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics)
- 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)

6. 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 séquenceurs disposent chacun d'un ordinateur et d'une imprimante jet d'encre couleur, les 5 thermocycleurs LC480 sont chacun équipés d'un ordinateur.

Les Bio-informaticiens disposent de 8 stations de travail très haute performance (multicœur, 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.

1.5.4. Plateformes techniques de l'IHU auxquelles le CNR a accès

A. Animalerie, expérimentation animale et production d'anticorps

(Responsable : Philippe Parola, PU-PH)

Depuis l'année 2011 le développement de la plateforme « Animalerie » a permis le développement des élevages d'arthropodes (tiques, poux, puces, moustiques, punaises et triatomés) et des programmes de recherche sur les interactions "arthropodes – microorganismes". Au second semestre 2019 a été recrutée Mme Noëlle Masotti, adjointe technique AMU, en prévision du départ en retraite de Mme Anne-Marie Gottrau.

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 triatomés 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. Plateforme microscopie pour l'étude morphologique et fonctionnelle des cellules, cytométrie

(Responsable : Jacques Bou Khalil, Ingénieur)

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 ci-dessous :

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)
- microscope électronique à balayage TM4000+ (Hitachi)

C. Plateforme Génomique

(Responsable : Pierre-Edouard Fournier, PU-PH)

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 2019, 550 génomes bactériens ont été séquencés par le laboratoire. Parmi ceux-ci, 17 souches de *Coxiella burnetii* et 9 souches de *Rickettsia*.

Au second semestre 2019, ont été recrutées Mmes Olivia Ardizzoni, technicienne AMU, et Ludivine Brécard, Ingénieur AP-HM, afin de renforcer l'effectif de la plateforme génomique.

D. Plateforme Bioinformatique

(Responsable : Anthony Levasseur, PU)

Depuis juin 2006, le CNR a constitué une plateforme de bioinformatique, composée de 3 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 des microorganismes :

1- 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.

2- 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, ...).

3- 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 du CNR dans une réunion hebdomadaire de génomique et la valorisation de ces résultats par la participation aux publications (voir publications).

1.6. Collections de matériel biologique

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., *Coxiella burnetii*.

A ce jour, plus de 10000 souches bactériennes sont conservées. L'importance de cette collection, la Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies: (CSUR, WDCM 875, <https://www.mediterranee-infection.com/diagnostic/les-centres-nationaux-de-reference-cnr/cnr-rickettsioses/collection-de-souches/>), est d'autant plus grande que la majorité de ces souches est unique. Cette collection conserve actuellement 663 souches de *Bartonella*, 226 souches de *Rickettsia* et 329 souches de *Coxiella burnetii*, constituant les plus grandes collections mondiales de souches de 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, dont les pathogènes humains (*R. heilongjiangensis* et *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.

B. Objectifs

L'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection s'est doté en 2018 d'une biobanque automatisée permettant de stocker 1 million d'échantillons et souches à -80°C et 2 millions à -20°C. La mise en fonction de cet équipement a été réalisée au mois de mai 2019. Les souches seront également conservées en azote gazeux à -196°C et sous forme lyophilisée à -20°C. Chaque appareil de congélation sera équipé d'un système d'alarme visuelle et sonore qui enverra en cas de problème un message d'alarme aux agents de sécurité de l'IHU. De plus, les tubes dans lesquels seront conservées les souches seront 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, 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 robotisée au sein de l'IHU.

C. 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 intracellulaires. Un technicien, Mr Frédéric Cadoret, 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 La Scola est habilité à la détention des souches bactériennes faisant l'objet d'une surveillance particulière (MOT) : *R. prowazekii* et *R. rickettsii* sous les références ADE-083212017-7 et ADE-083222017-8, respectivement).

C.1. 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.

C.2. La collection CSUR

Le Centre National de Référence des Rickettsioses a décrit 12 des 30 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 (<https://www.mediterranee-infection.com/diagnostic/les-centres-nationaux-de-reference-cnr/cnr-rickettsioses/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, **226 souches de *Rickettsia*, 329 souches de *Coxiella burnetii* et 663 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**. 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 (<https://www.mediterranee-infection.com/diagnostic/les-centres-nationaux-de-reference-cnr/cnr-rickettsioses/>). 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>florenciae</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>	433
	<i>rattaustraliani</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>	329
<u>Rickettsia</u>	<i>aeschlimannii</i>	7
	<i>africae</i>	37
	<i>akari</i>	1
	<i>amblyommatis</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>	88
	<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>	9
	<i>rhipicephali</i>	1
	<i>sibirica</i>	15
	<i>slovaca</i>	30
	<i>sp.</i>	2
	<i>tamurae</i>	1
	<i>typhi</i>	1
<u>Orientia</u>	<i>tsutsugamushi</i>	4

CSUR

Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies

WDCM 875

Professeur Didier RAOULT

Directeur

IHU Méditerranée-Infection

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	1	750.00
1				1	
2				1	
Total:					

Please fax (33 (0)413 732 402) or email the order form (didier.raoult@gmail.com)

CSUR

Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies

WDCM 875

Professeur Didier RAOULT

Directeur

IHU Méditerranée-Infection

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** of **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) 4 13 73 24 02) or email the order form (didier.raoult@gmail.com)

1.7. Démarche qualité du laboratoire

Le CNR s'est doté d'un guide de bonne exécution des analyses (GBEA) pour toutes les activités de culture, sérologie et détection moléculaire du laboratoire. Les activités de sérologie du CNR ont fait l'objet d'une accréditation COFRAC EN ISO 15189 (version 2012) sous la référence 8-3446. Ces activités ont fait l'objet du 09 au 12 octobre 2018 d'une visite des experts COFRAC (rapport d'activités SH-10-0469-1 v00).

2.1. Liste des techniques de référence

A. La sérologie

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

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 2012) sous la référence 8-3446. Ces activités ont fait l'objet du 09 au 12 octobre 2018 d'une visite des experts COFRAC (rapport d'activités SH-10-0469-1 v00).

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 persistante et focalisée.

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 panels 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 Kawazaki 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.

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.

B. 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 LC480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). 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 la détection moléculaire des *Rickettsia* 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 CIBLE	NOM	SEQUENCES	TAILLE	DILUTION	AMPLICO
BARTONELLA						
Toutes Bartonella	ITS	Barto ITS3 F	GATGCCGGGGAAGGTTTTC	19		104 pdb
	1ère intention	Barto ITS3 R	GCCTGGGAGGACTTGAACCT	20		
		Barto ITS3 P	6FAM- GCGGCGCGCTTGATAAGCGTG	20		
	ITS	Barto ITS2 F2	GGGGCCGTAGCTCAGCTG	18		171 pdb
		Barto ITS2 R2	TGAATATATCTTCTCTTCACAATTTC	26		
		Barto ITS2 P	6FAM- CGATCCCGTCCGGCTCCACCA	21		
Bartonella henselae	PAP	PAP 246F	TATGCCTTATGTGTGCTGGTGGT	22		151 pdb
	1ère intention	PAP 396R	ACCACCGCCAAGAGTGAAAC	20		
		PAP246/396_MBP	6FAM- CAAGCAGCAGATGATGCAGAAATCGC	26		
		PAP 246F/396R ancienne son	6FAM- CTGTCAGTTCTACTAAGGTAA			
	GROEL	GROEL 493F	GGTGTCTGGACAAAAGAGCGA	20		151 pdb
	2ème intention	GROEL 643R	TTGCTCCACCAACACGGATA	20		
		GROEL P 493F/643R	6FAM- AATTGCAAGAAGACTTGCT	20		
Bartonella quintana	yopP	B qui 11580F	TAAACCTCGGGGGAAGCAGA	20		134 pdb
	1ère intention	B qui 11580R	TTTCGTCTCAACCCCATCA	20		
		B qui 11580P	6FAM- CGTTGCCGACAAGACGTCTCTGC	23		
	fabF3	B qui 05300F	GCTGGCCTTGCTCTTGATGA	20		139 pdb
		B qui 05300R	GCTACTCTGCTGCTCTTGA	20		
		B qui 05300P	6FAM- TGCAGCAGGTGGAGGAGAACGTG	23		
COXIELLA						
Coxiella burnetii	hypothetical p.	IS30a 3F	CGCTGACCTACAGAAATATGTCC	23		164 pdb
	1ère intention	IS30a 3R	GGGGTAAGTAAATAATACCTTCTGG	25		
		IS30a F3-R3 P	6FAM- CATGAAGCGGATTTATCAATACGTGTATGC	29		
	IS1111A	IS 1111 0706 F	CAAGAAACGTATCGCTGTGGC	21		154 pdb
	confirmation	IS 1111 0706 R	CACAGAGCCACCGTATGAATC	21		
		IS1111 07-06 P	6FAM- CCGAGTTCGAAACAATGAGGGCTG	24		
EHRlichia						
Anaplasma phagocytophilum	polA	A_pha0001F	TTTGATTTCGGGGTCGAAAAA	20		121 pdb
	1ère intention	A_pha0001R	AACGCTTCAACAGCCTCAGC	20		
		A_pha0001P	6FAM- TCGCCCTAAAGCACCAGAGGATCTG	25		
	gatA	A_pha0748F	CGCACTACCGCATGCTCTG	19		129 pdb
		A_pha0748R	AGCCCATGGCAAATTCATCC	20		
		A_pha0748P	6FAM- TGCTTGCAATGATGGGAAATTGAACA	26		
	orf 1395	A_pha1395F	CAGAAGAACCAGCGCGATA	20		138 pdb
		A_pha1395R	TCGACGTAGGTGAGCTGCAA	20		
		A_pha1395P	6FAM- TGACCAAAAGATGCACATGGTGACA	25		
Ehrlichia canis	taredoxin related	E_can0701F	TGAGGCCATTAAAGAATTCACAA	23		113 pdb
	1ère intention	E_can0701R	TGAAGCTCTCCACTGTGGTACATTT	25		
		E_can0701P	6FAM- AGGTGAGTTTATTGGGTGCGACA	23		
	hyp. p.	E_can0503F	CAGCAAATTCCAATCTGCACCTTC	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- GCGCGTTAAAAGAAAAGAAGAGAGAC	26		

C. 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. Les techniciens y 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.

2.2. Liste des techniques recommandées par le CNR

Fièvre Q :

Sérologie par immunofluorescence

Détection moléculaire : par ciblage de la séquence d'insertion IS1111

Génotypage : multispacer typing ou séquençage génomique

***Rickettsia* :**

Sérologie par immunofluorescence

Détection moléculaire : par ciblage des gènes GLTA et OMPA

Génotypage : multispacer typing ou séquençage génomique

***Bartonella* :**

Sérologie par immunofluorescence

Détection moléculaire : par ciblage du gène FTSZ et de la séquence intergénique 16S-23S rRNA

Génotypage : multispacer typing ou séquençage génomique.

Annexe 3 : Autres Informations

Déclaration Publique d'Intérêts

FOURNIER PIERRE-EDOUARD

Directeur du Centre de national de référence des Rickettsies, *Coxiella* et *Bartonella*

Déclaration Publique d'Intérêts

Le **21/01/2019 19:36:43**

Je soussigné(e) **FOURNIER PIERRE-EDOUARD**

Reconnais avoir pris connaissance de l'obligation de déclarer tout lien d'intérêts, direct ou par personne interposée, que j'ai ou ai eu au cours des cinq dernières années, avec les entreprises, établissements ou organismes dont les activités, les techniques et les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes au sein duquel/desquels j'exerce mes fonctions ou ma mission, ou de l'instance/des instances collégiale(s), commission(s), conseil(s), groupe(s) de travail dont je suis membre ou auprès duquel/desquels je suis invité(e) à apporter mon expertise, ainsi qu'avec les sociétés ou organismes de conseil intervenant dans les mêmes secteurs.

Il m'appartient, à réception soit de l'ordre du jour de chaque réunion pour laquelle je suis sollicité(e), soit de l'expertise que l'organisme souhaite me confier, de vérifier si l'ensemble de mes liens d'intérêts sont compatibles avec ma présence lors de tout ou partie de cette réunion ou avec ma participation à cette expertise. En cas d'incompatibilité, il m'appartient d'en avertir l'interlocuteur désigné au sein de l'institution et, le cas échéant, le président de séance avant sa tenue. En cas de conflits d'intérêts, ma présence est susceptible d'entacher d'irrégularité les décisions, recommandations, références ou avis subséquents et d'entraîner leur annulation.

J'indique mon numéro RPPS (répertoire partagé des professionnels de santé), si je suis un professionnel de santé : 10003374542

Je m'engage à actualiser ma DPI à chaque modification de mes liens d'intérêts. En l'absence de modification, je suis tenu(e) de vérifier ma DPI au minimum annuellement.

Article L. 1454-2 du code de la santé publique : « Est puni de 30 000 euros d'amende le fait pour les personnes mentionnées au I et II de l'article L. 1451-1 et à l'article L. 1452-3 d'omettre, sciemment, dans les conditions fixées par ce même article, d'établir ou de modifier une déclaration d'intérêts afin d'actualiser les données qui y figurent ou de fournir une information mensongère qui porte atteinte à la sincérité de la déclaration. »

Liste des missions/fonctions

Institution :

Santé Publique France (SPF)

Instance:

RESPONSABLES CNR MANDAT 2017-2022

Mandat :

Autre - Non renseignée

1. Activité(s) principale(s), rémunérée(s) ou non, exercée(s) actuellement et au cours des 5 dernières années, à temps plein ou à temps partiel

Activité(s) salariée(s)

UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE

Adresse : 58 Boulevard Charles Livon 13284 MARSEILLE 07 FRANCE

Fonction : Professeur des Universités

Période : 01/09/2008 à aujourd'hui

Spécialité : Microbiologie Clinique

Lieu d'exercice : IHU Méditerranée-Infection 13005 MARSEILLE 05 FRANCE

2. Activité(s) exercée(s) à titre secondaire

2.1. Participation à une instance décisionnelle d'un organisme public ou privé dont l'activité, les techniques ou les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

COMITÉ DE LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DES HÔPITAUX DE L'AP-HM

Fonction occupée : Président

Rémunération : aucune

Période : 03/2010 - 03/2016

2.2. Activité(s) de consultant, de conseil ou d'expertise exercée(s) auprès d'un organisme public ou privé entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

HCERES

Fonction occupée : Jury d'évaluation d'unité de recherche

Sujet : Evaluation de l'unité 'infection et inflammation' du Pr Jean-Louis HERRMANN

Rémunération : Au déclarant

Montant perçu (Déclarant) : Total 200 euros

Période : 25/11/2018 - 26/11/2018

2.3. Participation(s) à des travaux scientifiques et études pour des organismes publics ou privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.3.1 Participation à des essais et études

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.3.2 Autres travaux scientifiques

HAUT COMITÉ DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Sujet : Recommandations nationales - Recommandations sur la prévention et la prise en charge de la fièvre Q en France - Rédaction de Recommandations sur la fièvre Q

Rémunération : aucune

Période : 05/2012 - 10/2013

2.4. Rédaction d'article(s) et intervention(s) dans des congrès, conférences, colloques,

réunions publiques diverses ou formations organisés ou soutenus financièrement par des entreprises ou organismes privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.4.1 Rédaction d'article(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.4.2 Intervention(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.5. Invention ou détention d'un brevet ou d'un produit, procédé ou toute autre forme de propriété intellectuelle non brevetée en relation avec le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

3. Direction d'activités qui ont bénéficié d'un financement par un organisme à but lucratif dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

4. Participations financières directes, sous forme d'actions ou d'obligations détenues et gérées directement ou de capitaux propres dans le capital d'une société dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

5. Proches parents ayant des activités ou des intérêts financiers dans toute structure dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

6. Fonctions et mandats électifs exercés actuellement

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

7. Autre lien, dont vous avez connaissance, qui est de nature à faire naître des situations de conflits d'intérêts

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique