

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

ANNEE 2001 - THESE No 24

BORDETELLA BRONCHISEPTICA :
UNE ZONOSE EMERGENTE ?

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 2 avril 2001
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Christian BARNY
né le 31 mai 1962
à *Strasbourg (Bas-Rhin)*



REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le Professeur Dominique Peyramond d'avoir accepté la présidence du jury.

Je remercie Monsieur le Docteur Luc Chabanne pour la bienveillance avec laquelle il a suivi et corrigé ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Luc Cadoré pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Les analyses ont été réalisées dans le Laboratoire de Référence des *Bordetella* dirigé par Madame le Docteur Nicole Guiso. Je la remercie d'avoir initié ce travail et d'en avoir guidé la rédaction.

Je remercie les membres du Laboratoire des *Bordetella* : Pascale Gueirard, Elisabeth Njamkepo, Christian Weber, Sabine Thiberge, Caroline Boursaux-Eude, François Rimlinger, Anne Le Flèche, Gilberte Coralie, Laurent Guillemot et tous les autres pour la gentillesse avec laquelle ils ont répondu à mes questions.

Je remercie Monsieur le Docteur Alain Le Coustumier pour les conseils qu'il m'a prodigués lorsque j'ai débuté ce travail.

Je remercie les membres de l'Association des Vétérinaires d'Animaux de Compagnie en Collectivités : Alain Ganivet, Sophie Lemonier, Jean Marie Sirieix, Xavier Bastian, Thierry Abric, Alain Grimberg et Jean-Pascal Giraud pour leur collaboration dans la réalisation des prélèvements et pour m'avoir fait bénéficier de leur expérience pratique.

Je remercie ma famille dont le soutien ne m'a jamais quitté.

A Martine et Manon

DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Directeur : Professeur J.-F. CHARY

Le 15/01/ 2001

DEPARTEMENT	PREX	PRI	PRE2	MC	Contractuel, associé & IPAC	AERC	Chargés de consult et d'enseignement
DEPART SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE Microbiologie, Immunologie, Pathologie Gît.		Y. RICHARD M. PRAVE C. CHAIVE G. CHANTEGRELET	G. BOURDOISEAU P. DEMONT A. LACHERETZ	A. KODJO D. GREZEL V. GUERIN J. VIALARD L. ZENNER C. VERNIZOY A. GONTHIER	M. ARTOIS PR associé	M.P. CALLAIT	
DEPART DES ANIMAUX DE COMPAGNIE Anatomie Chirurgie et Anesthésiologie Dermatologie - Cancérologie Médecine interne Imagerie médicale		E. CHATELAIN J.P. GENEVOIS J.P. MAGNOL	T. ROGER D. FAU C. FOURNEL	M.A. BERTHELET S. SAWAYA E. TRONCY D. RÉMY T. MARCHAL L. CHABANNE P. BARTHEZ	C. DECOSNE-JUNOT MC WATRELOT-VIRIEUX MC PERRON-LEPAGE ... MC A. BLAVIER MC	C. CAROZZO F. PONCE C. ESCRIOU	N. DISS M. JUNOT M. BRUSSAUD 0,75 S. KEROACK A. SCALA 0,5
DEPART DES PRODUCTIONS ANIMALES Zootechnie, Éthologie & Économie rurale Sérum et Alimentation Bovins & Porcs de la Reproduction Félins Animaux de Production		M. FRANCK J.P. DESCHANEL J.F. BADINAND P. BEZILLE	M. RACHAIL T. ALOGNINOUIWA	D. GRANCHER L. ALVES de OLIVEIRA G. EGON P. GUERIN R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND	A. DERNBURG MC contractuel N. GIRAUD MC contractuel D. LAURENT MC associé 0,2		S. BUFF T. OSSET
DEPART SCIENCES BIOLOGIQUES Physiologie - Thérapeutique Biophysique - Biochimie Génétique et Biologie moléculaire Pharmacie - Toxicologie - Législation du Médicament Bio-Mathématiques Langues	P. DELATOUR G. LORGUE	R. BOVIN F. GARNIER	E. BENOIT F. GRAIN P. JAUSSAUD G. KECK	J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN T. BURONFOSSE V. LAMBERT P. BERNY P. SABATIER M.L. DELIGNETTE 80 % K. CHALVET-MONFRAY	M. BOCCQUET A. FAVIER		
DEPART HIPPIQUE Pathologie équine Clinique équine Expérimentation équine	O. LEPAGE	J.L. CADORE C. FLEURY		A. LEBLOND S. MARTINOT	A. BENAMOU-SMITH MC		

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. HISTORIQUE	2
II. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES	2
1. Classification	2
2. Caractères morphologiques	3
2.1. Microscopie optique	3
2.2. Microscopie électronique	3
3. Caractères cultureux	4
4. Caractères biochimiques	5
5. Le genre <i>Bordetella</i> et les autres genres	5
5.1. Le genre <i>Alcaligenes</i>	5
5.2. Groupes IVc-2 et IVe	5
6. Les supports moléculaires de la virulence et du pouvoir pathogène des <i>Bordetella</i>	5
6.1. Les adhésines	6
6.1.1. Les fimbriae	6
6.1.2. L'hémagglutine filamenteuse	6
6.1.3. La pertactine	6
6.2. Les toxines	7
6.2.1. La toxine dermonécrotique	7
6.2.2. La toxine cytotrachéale	7
6.2.3. L'adénylcyclase-hémolysine	7
6.2.4. Le lipopolysaccharide	8
6.2.5. La toxine pertussis	8
6.2.6. Le système de sécrétion de type III	8
6.3. Le flagelle	9
6.4. L'uréase	9
7. Régulation de l'expression des facteurs de virulence	9
7.1. Le système <i>bvg</i>	9
7.2. La variation de phase	10
7.3. La modulation antigénique	10
7.4. Autres mécanismes de régulation	10
7.4.1. La protéine BTR	10
7.4.2. La régulation par le fer	11
III. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET TYPAGE	11
1. Diagnostic biologique	11
1.1. Culture	11
1.2. Amplification génique	12
1.3. Sérologie	12
2. Typage	12
2.1. Techniques phénotypiques	13

2.1.1. Sérotypie	13
2.1.2. Résistance aux agents microbiens	13
2.1.3. Migration électrophorétique d'enzymes	13
2.2. Techniques génétiques	13
2.2.1. Restriction à nombreux sites de coupure	13
2.2.2. Restriction avec un faible nombre de coupures et Electrophorèse en champ pulsé	14
IV. POUVOIR PATHOGENE CHEZ L'ANIMAL	14
1. Implication de <i>Bordetella bronchiseptica</i> dans le syndrome de la toux de chenil	
2. Infections respiratoires félines à <i>Bordetella bronchiseptica</i>	15
2.1. Isolement de <i>Bordetella bronchiseptica</i> chez des chats présentant des affections respiratoires	15
2.2. Reproduction expérimentale de la maladie	15
2.3. Prévalence	16
2.4. Portage asymptomatique	16
2.5. Contamination interspécifique	16
3. Implication de <i>Bordetella bronchiseptica</i> dans le syndrome de la rhinite atrophique chez le porc	17
3.1. Clinique	17
3.1.1. Forme non progressive	17
3.1.2. Forme progressive	17
3.2. Prévalence	17
4. Infections à <i>Bordetella bronchiseptica</i> chez les rongeurs et les lagomorphes	17
5. Infections à <i>Bordetella bronchiseptica</i> chez le cheval	18
6. Infections à <i>Bordetella bronchiseptica</i> chez les primates	19
7. Infections à <i>Bordetella bronchiseptica</i> dans la faune sauvage	19
V. POUVOIR PATHOGENE CHEZ L'HOMME	20
1. Fréquence de l'infection à <i>BBS</i> chez l'homme	20
2. Répartition dans la population et importance du terrain	20
3. Les formes cliniques	21
3.1. Les formes respiratoires	21
3.2. Les formes extra-pulmonaires	21
VI. DEMONSTRATION DU CARACTERE ZOONOTIQUE DE <i>BORDETELLA BRONCHISEPTICA</i>	22
1. Historique	22
2. Cas princeps	22
2.1 Clinique et épidémiologie	22
2.2. Démonstration de l'identité des isolats par Electrophorèse en champ pulsé	
2.3. Persistance de <i>Bordetella bronchiseptica</i> chez l'hôte	23
VII. ANTIBIOTHERAPIE	24
1. Corrélation entre les Concentrations Minimales Inhibitrices et les diamètres d'inhibition	24
2. Etude de la sensibilité par classe d'antibiotique	25
2.1. Bêtalactamines	25
2.1.1. Pénicillines	25
2.1.2. Céphalosporines et monobactames	25

2.13. Carbapénèmes	25
2.2. Aminosides et apparentés	25
2.3. Cyclines	25
2.4. Macrolides et apparentés	26
2.5. Sulfamides et triméthoprime	26
2.6. Quinolones	26
2.7. Phénicolés	26
3. Facteurs de variation de la sensibilité	27
VIII. VACCINS	27
1. Immunologie de l'appareil respiratoire	27
1.1. Les facteurs mécaniques	28
1.2. Les facteurs solubles	28
1.3. Les facteurs immunologiques	28
1.3.1. Réponses immunitaires naturelles	28
1.3.2. Réponses immunitaires spécifiques	28
1.3.2.1. Immunité contre les bactéries extracellulaires	29
1.3.2.2. Immunité contre les bactéries intracellulaires	29
2. Les vaccins actuels	29
2.1. Vaccins entiers inactivés	30
2.2. Vaccins vivants atténués	30
2.2.1. Généralités	30
2.2.2. Innocuité de la souche vaccinale S-55	31
2.3. Vaccins dans d'autres espèces	31
2.3.1. Vaccins félins	31
2.3.2. Vaccins porcins	32
3. Vaccins de seconde génération	32
3.1. Généralités	32
3.2. Elaboration d'un vaccin acellulaire	32
IX FACTEURS D EMERGENCE	33
1. Facteurs liés à l'homme	34
1.1. Fragilisation du terrain	33
1.2. Antibiothérapie inadaptée	34
1.3. Protection croisée avec <i>Bordetella pertussis</i>	34
2. Facteurs liés à la relation homme / animal	35
3. Facteurs liés à la modification des techniques d'élevage	35
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	37
I. MATERIEL ET METHODES	37
1. Population étudiée	37
2. Technique de prélèvement	37
3. Méthodes d'isolement et d'identification	38
4. Mise en culture du vaccin Intra-trac 1	39
5. Recherche des facteurs de virulence	39
6. Typage par Electrophorèse en champ pulsé	39
7. Discrimination entre les souches sauvages et les souches vaccinales	39
7.1. Anamnèse	39

7.2. Etat clinique	39
7.3. Phénotype	40
7.4. Electrophorèse en champ pulsé	40
7. Détermination de la dose létale 50 par infection respiratoire dans le modèle murin (Vaccin Intra-trac 1)	40
II. RESULTATS	41
1. Résultat global	41
1.1. Nombre d'isolats de <i>Bordetella bronchiseptica</i> collectés	41
1.2. Phénotype des isolats	41
2. Etude par groupe	41
2.1. Groupe I	41
2.2. Groupe II	42
2.3. Groupe III	43
2.4. Groupe IV	44
3. Données concernant la virulence de la souche vaccinale Intra-trac 1	45
3.1. Phase	45
3.2. Expression des facteurs de virulence	45
3.3. Détermination de la dose létale 50 par infection respiratoire	45
III. DISCUSSION	46
1. Taux d'isolement de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	46
1.1. Isolement de <i>BBS</i> chez les chiens atteints de toux de chenil	
1.2. Isolement de <i>BBS</i> chez les chiens ne présentant aucun symptôme de TC	46
1.3. Isolement de <i>BBS</i> dans le conduit de ventilation	47
2. Analyse préliminaire de l'immunité induite par les vaccins Pneumodog et Intra-trac 1	47
2.1. Vaccin Pneumodog	47
2.1.1. Protection contre la toux de chenil	47
2.1.2. Protection contre l'infection par <i>BBS</i>	47
2.1.3. Protection contre le portage asymptomatique de <i>BBS</i>	47
2.2. Vaccin Intra-trac1	48
2.2.1. Protection contre la toux de chenil	48
2.2.2. Protection contre l'infection par <i>BBS</i>	48
2.2.3. Protection contre le portage asymptomatique de <i>BBS</i>	48
2.3. Association des vaccins Pneumodog et Intra-trac1	48
2.3.1. Protection contre la toux de chenil	48
2.3.2. Protection contre l'infection par <i>BBS</i>	48
2.3.3. Protection contre le portage asymptomatique de <i>BBS</i>	49
3. Données concernant l'innocuité du vaccin Intra-trac 1	49
3.1. Réactions vaccinales	49
3.2. Persistance de la souche dans les cavités nasales des chiens vaccinés	49
3.3. Passage de la souche vaccinale de chien à chien	49
3.4. Caractère hémolytique et expression des facteurs de virulence	49
3.5. Détermination de la dose létale 50 par infection respiratoire	50
3.6. Stabilité de la souche vaccinale	50
4. Persistance de <i>Bordetella bronchiseptica</i> chez les chiens infectés	50
CONCLUSIONS	52

PERSPECTIVES

53

BIBLIOGRAPHIE

54

TABLEAUX

- Tableau 1.** Caractéristiques des *Bordetella*
- Tableau 2.** Caractères biochimiques des *Bordetella*
- Tableau 3.** Différenciation entre *Bordetella bronchiseptica* et des espèces phénotypiquement semblables
- Tableau 4.** Cas cliniques d'infections humaines à *BBS* (1)
- Tableau 5.** Cas cliniques d'infections humaines à *BBS* (2)
- Tableau 6.** Cas cliniques d'infections humaines à *BBS* (3)
- Tableau 7.** Cas cliniques d'infections humaines à *BBS* (4)
- Tableau 8.** Vaccins CHP, CHPPi et traitements
- Tableau 9.** Isolement et typage de *BBS* dans les groupes I et II
- Tableau 10.** Isolement et typage de *BBS* dans les groupes III et IV
- Tableau 11.** Isolement de la souche vaccinale Intra-trac 1 et intervalle entre la vaccination et le prélèvement
- Tableau 12.** Etat clinique des chiens après la vente (groupe I et II)
- Tableau 13.** Etat clinique des chiens après la vente (groupe III et IV)

FIGURES

- Figure 1.** Evolution du genre *Bordetella*
- Figure 2.** Coopération des déterminants de virulence
- Figure 3.** Modèle de régulation de l'expression des gènes par le système BvgAS
- Figure 4.** Profils en ECP après restriction avec *Spe* I (1 mars)
- Figure 5.** Profils en ECP après restriction avec *Spe* I (14 avril)
- Figure 6.** Profils en ECP après restriction avec *Spe* I (22 mai)
- Figure 7.** Profils en ECP après restriction avec *Xba* I (7 mars)
- Figure 8.** Profils en ECP après restriction avec *Xba* I (11 mai)
- Figure 9.** DL50 de la souche vaccinale Intra-trac 1

SIGNIFICATION DES ABBREVIATIONS UTILISEES

AC-Hly	Adénylcyclase-hémolysine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGG	Agglutinogènes
<i>BA</i>	<i>Bordetella avium</i>
<i>BBS</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>BHI</i>	<i>Bordetella hirzii</i>
<i>BHO</i>	<i>Bordetella holmesii</i>
<i>BP</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>BPP</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>
<i>BT</i>	<i>Bordetella trematum</i>
<i>bvg</i>	<i>Bordetella</i> virulence genes
CDC	Center for Disease Control
CFU	Colony forming unit
TDN	Toxine dermonécrotique
FHA	Hémagglutinine filamenteuse
Fim	Fimbriae
LPS	Lipopolysaccharides
PRN	Pertactine
<i>vag</i>	Virulence activated genes
<i>vrg</i>	Virulence repressed genes

INTRODUCTION

Bordetella bronchiseptica est un agent pathogène du tractus respiratoire des mammifères. Le caractère zoonotique de ce bacille présentant une très grande homologie avec *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*, les deux agents de la coqueluche chez l'homme, a été démontré récemment (Gueirard *et al.*, 1995).

Chez l'animal, *Bordetella bronchiseptica* est très fréquemment impliquée dans des affections respiratoires évoluant dans les collectivités (trachéite infectieuse canine, rhinite atrophique du porc...).

Dans l'espèce humaine, la fréquence des isollements de *Bordetella bronchiseptica* est faible mais elle semble augmenter depuis quelques années. La bactérie se comporte comme un pathogène opportuniste, atteignant généralement des sujets immunodéprimés ou présentant une atteinte respiratoire préalable.

Après l'étude des caractères bactériologiques et des affections animales et humaines, nous envisagerons les possibles facteurs d'émergence de cette zoonose.

Nous présenterons ensuite les résultats d'une enquête menée sur une population de chiens présents dans quatre animaleries avec isolement de *Bordetella bronchiseptica*, typage des souches et analyse de l'immunité induite par les vaccins.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. HISTORIQUE

Bordetella bronchiseptica a été isolée pour la première fois par Ferry en 1910 chez des chiens atteints de la maladie de Carré (Ferry, 1910). Croyant découvrir l'agent causal de cette maladie alors qu'il ne s'agissait que d'un germe de surinfection, il isole de manière répétée au niveau des bronches et de la trachée de ces chiens, une bactérie qu'il nomme *Bacillus bronchicanis*. Il la décrit sous la forme d'un petit bacille mobile aérobie strict à gram négatif ne fermentant pas les glucides et parvient à reproduire une infection respiratoire en réalisant des inoculations intranasales chez des chiens de laboratoire.

En 1911, Mac Gowan isole *Bordetella bronchiseptica* chez des chats, des lapins, des cobayes, une chèvre, des singes et des furets (Mac Gowan, 1911).

Ferry l'identifie à son tour chez d'autres animaux que le chien et la rebaptise *Bacillus bronchisepticus* (Ferry, 1912).

Ces premiers travaux décrivent également l'isolement de *Bacillus bronchisepticus* par Ferry et par Mac Gowan à partir d'expectorations de deux garçons animaliers atteints d'une infection respiratoire.

L'hypothèse d'un lien entre *Bacillus bronchisepticus* et *Bacillus pertussis*, l'agent de la coqueluche découvert en 1906 par Bordet et Gengou, est déjà évoqué en 1915 par Rhea. Lors de l'examen cytologique d'épithéliums respiratoires, il observe des bacilles minuscules disposés entre les cils des cellules épithéliales (Rhea, 1915), aspect considéré comme spécifique du bacille de la coqueluche. En 1918, Ferry et Noble montrent que des réactions croisées existent entre les deux bactéries : un immunsérum de lapin infecté par *Bacillus bronchisepticus* agglutine aussi bien la bactérie homologue que le bacille de Bordet-Gengou (Ferry and Noble, 1918).

En 1926, la maladie est à nouveau décrite chez l'homme par Brown qui isole *Bacillus bronchisepticus* dans les expectorations d'une fillette atteinte d'un syndrome pseudo-coquelucheux (Brown, 1926).

La confirmation par Dunkin et Laidlaw de l'étiologie virale de la maladie de Carré associée au fait que plusieurs auteurs ne parviennent pas à reproduire expérimentalement la maladie remet en cause le caractère pathogène de *Bacillus bronchicanis* (Schoichi, 1927) et est à l'origine d'un désintéret durable envers cette bactérie.

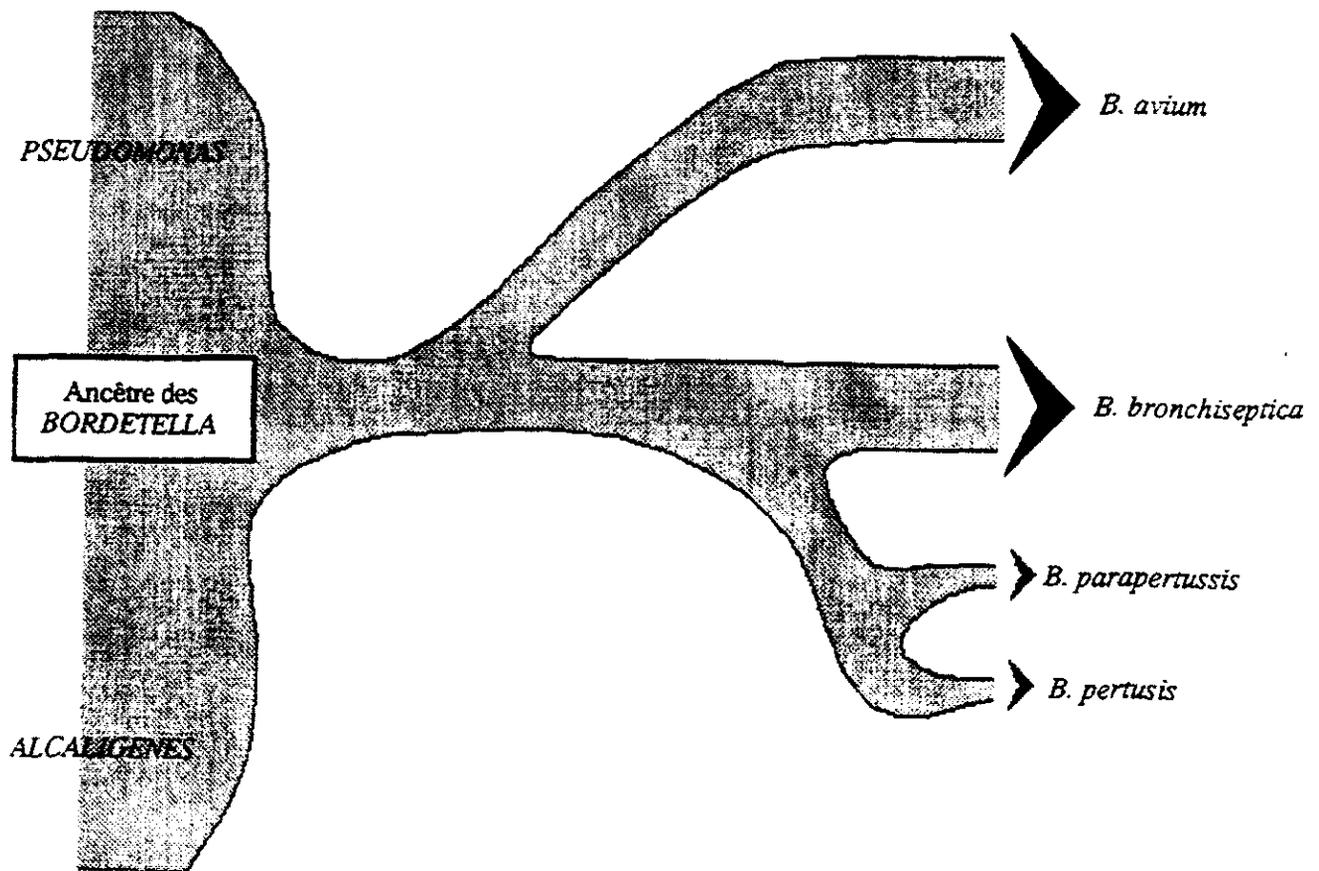
En 1952, le genre *Bordetella* est défini par Moreno-Lopez en hommage à Jules Bordet (Moreno-Lopez, 1952). Il fait partie de la famille *Pasteurella-Haemophilus-Bordetella* et comprend, outre *Bordetella pertussis*, deux autres espèces : *Bordetella parapertussis* et *Bordetella bronchiseptica*.

II. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

1. Classification

Le genre *Bordetella* comprend initialement à sa création *Bordetella pertussis* (BP), *Bordetella parapertussis* (BPP) et *Bordetella bronchiseptica* (BBS).

Figure 1. Evolution du genre *Bordetella*



Bordetella

En 1967, une quatrième espèce, *Bordetella avium* (BA), est isolée à partir de dindonneaux atteints de rhinotrachéite (Filion *et al.*, 1967).

Récemment, trois nouvelles espèces ont été décrites. *Bordetella hinzii* (BHI) a été isolée en 1994 à partir du sang d'un patient VIH+ (Cookson *et al.*, 1994). Proche de BA, cette bactérie est responsable d'infections respiratoires secondaires ou opportunistes chez les volailles. *Bordetella holmesii* (BHO) (Weyant *et al.*, 1995) est isolée souvent à partir d'hémocultures de sujets jeunes et en mauvais état général mais aussi lors d'affections respiratoires. *Bordetella trematum* (BT) a été isolée chez l'homme à partir d'infections auriculaires (Vandamme *et al.*, 1996).

Evolution du genre Bordetella

Une étude de Kloos, basée sur des réactions d'hybridation ADN-ADN a mis en évidence un degré de similitude très élevé entre BP, BPP et BBS (Kloos *et al.*, 1981). Compte tenu de ces résultats, ces auteurs ont proposé le regroupement de ces bactéries dans une seule et même espèce, elle-même divisée en trois sous-espèces.

Cette étroite parenté génétique et le fait que la première description clinique de la coqueluche ne date que de 1578 (De Baillou, 1640) suggère que ces trois espèces ne se sont individualisées que très récemment (Arico *et al.*, 1987a). Les genres *Alcaligenes* et *Pseudomonas* sont très proches du genre *Bordetella* et regroupent des bactéries largement répandues dans l'environnement. Il a été émis l'hypothèse que les ancêtres du genre *Bordetella* seraient des bactéries vivant dans l'environnement extérieur qui auraient, au cours de l'évolution, acquis le pouvoir d'infecter les animaux homéothermes. La première espèce à diverger serait BA car elle est la plus éloignée dans l'échelle de l'évolution. Ensuite, à partir de la ligne dominante représentée par BBS, un clone se serait spécifiquement adapté à l'homme et serait à l'origine des espèces BP et BPP (Rappuoli, 1994) (Figure 1).

2. Caractères morphologiques

2.1. Microscopie optique

BBS se présente sous la forme d'un coccobacille à gram négatif, à coloration bipolaire et asporulé.

Lorsque les conditions de culture sont favorables, les bactéries sont isolées, en diplocoques ou encore en petits amas. En subculture ou dans un milieu ne contenant pas tous les facteurs de croissance nécessaires, elles adoptent des formes en larges bâtonnets allongés.

Les souches virulentes de BBS sont immobiles. Par contre, les variants, appelés phase IV (cf § 3), de BBS (Goodnow, 1980) sont mobiles grâce à la synthèse de flagelles.

2.2. Microscopie électronique

Les dimensions de la bactérie BBS varient considérablement en longueur, moins en largeur. Richter donne les mesures suivantes : de 0,5 à 3 µm pour la longueur et de 0,4 à 0,5 µm pour le diamètre (Richter and Kress, 1967). Selon la plupart des auteurs, BBS ne possède pas de capsule, bien que Nakase en ait décrit une en utilisant la coloration de Lawson (Nakase, 1957a). BBS présente une paroi bactérienne fortement plissée par des lobules atteignant plusieurs centaines d'angströms en largeur. Les flagelles sont distribués de façon péritriche autour des corps bactériens et semblent être plus épars aux pôles qu'ailleurs. Bémis *et al.* (1977) ont décrit la présence de longues formes filamenteuses qui s'étendent à la surface des bactéries virulentes et qui donnent l'aspect d'une chevelure. Ces structures appelées fimbriae joueraient un rôle dans l'adhésion de la bactérie sur les cellules cibles de l'hôte.

Tableau 1. Caractéristiques des *Bordetella*

	Forme des bactéries	Taille des colonies après 48 heures de culture	Durée de la croissance sur gélose au sang	Hémolyse sur gélose au sang
<i>B. bronchiseptica</i> phase I	coccobacilles	< 1 mm	1 à 2 jours	+
<i>B. bronchiseptica</i> phase IV	bâtonnets larges et allongés	> 2 mm	1 jour	-
<i>B. pertussis</i> phase I	coccobacilles	0,2 mm	3 à 6 jours	+
<i>B. pertussis</i> phase IV	filaments	1 mm	2 à 3 jours	-
<i>B. parapertussis</i>	coccobacilles	> 1 mm pigmentées	2 à 3 jours	+
<i>B. holmesii</i>	coccobacilles et rares bâtonnets	< 1 mm pigmentées	3 jours	-
<i>B. hinzii</i>	bâtonnets	1 mm	1 à 2 jours	-
<i>B. avium</i>	bâtonnets	> 1 mm	1 à 2 jours	-

3. Caractères cultureux

BBS est une bactérie aérobie stricte dont la température optimale de croissance est de 35-37°C. A la différence de *BP*, *BHO* et *BPP*, *BBS* présente une culture aisée et rapide dans les 24 à 48 heures sur des milieux ordinaires tels que les géloses nutritives. Elle peut également être cultivée sur le milieu de Mac Conkey qui contient des sels biliaries capables d'inhiber la croissance de certaines espèces de bactéries à gram positif. Tout comme *BP* et *BPP*, *BBS* peut être facilement cultivée sur le milieu de Bordet-Gengou. Ce dernier est composé d'un milieu de base (pomme de terre cuite dans un mélange glycérol-eau, additionné de chlorure de sodium et de gélose) auquel on ajoute 20 à 30 % de sang défibriné de mouton ou de cheval. Après 24 heures d'incubation, de petites colonies de la taille d'une tête d'épingle apparaissent. Au bout de 48 heures, elles deviennent rondes, brillantes, de taille supérieure aux colonies de *BP*, présentent un aspect en gouttelettes de rosée et s'entourent d'un halo d'hémolyse de diamètre supérieur à celui obtenu avec *BP*. Après une incubation plus longue, les colonies prennent un aspect grisâtre (Goodnow, 1980). Les conditions de culture sont très importantes à considérer dans le contexte de l'étude de la pathogénicité des *Bordetella* chez l'homme et chez l'animal. Des bactéries isolées à partir d'animaux infectés sont toujours plus virulentes que des bactéries isolées après plusieurs passages sur milieu gélosé (Guiso *et al.*, 1989).

In vitro, l'activité métabolique majeure des *Bordetella* est l'oxydation des aminoacides. *BBS* utilise tous les aminoacides à l'exception de l'arginine, de la lysine et de l'histidine. L'acide aminé essentiel utilisé est l'acide glutamique. L'acide nicotinique et les sulfures organiques tels que la cystine, la cystéine ou le glutathion sont des facteurs additionnels essentiels (Pittman, 1984).

Il a été démontré que *BBS* était capable de survivre et de se multiplier dans les eaux naturelles (Porter *et al.*, 1991 ; Porter and Wardlaw, 1993). Le nombre de bactéries après 48 à 72 heures d'incubation à 37°C dans des eaux de lac ou de mer est augmenté d'un facteur huit. Les bactéries restent viables pendant au moins trois semaines à 37°C et pour certaines souches pendant six mois. Les mêmes expériences, réalisées à 10°C montrent une multiplication bactérienne comparable à la croissance bactérienne à 37°C, suivie d'un maintien de la viabilité pendant au moins 6 mois. *BBS* est également capable de survivre sur le sol pendant au moins quarante cinq jours (Mitscherlich and Marth, 1984). L'importance épidémiologique de ces données est considérable : l'environnement constitue un réservoir potentiel dans lequel *BBS* pourrait survivre et se multiplier.

Tout comme *BP* et *BPP*, *BBS* adopte différentes formes en fonction des conditions de culture. Nakase en 1957 distingue quatre phases : phases I, II, III et IV ou phase rugueuse (R) (Nakase, 1957a ; Nakase, 1957b ; Nakase, 1957c ; Nakase, 1957d). Les colonies de phase I (lisses) sont pathogènes pour la souris. Elles sont relativement instables et se transforment facilement en bactéries de phase II, III et IV après plusieurs passages sur milieu artificiel. Les colonies de phase IV (R) sont avirulentes (Goodnow, 1980).

De ces quatre phases, Bemis n'en décrit que trois (Bemis *et al.*, 1977) (Tableau 1) :

- les bactéries en phase I, isolées sur milieu Bordet-Gengou, se présentent sous la forme de colonies lisses (S), hémolytiques, opaques, immobiles et de petite taille (≤ 1 mm) et avec un aspect en gouttelettes de rosée. Ces bactéries sont virulentes, c'est à dire qu'elles synthétisent et sécrètent de nombreux facteurs impliqués dans la pathogénicité bactérienne. Elles correspondent aux bactéries de la phase I décrites par Nakase.

Tableau 2. Caractères biochimiques des *Bordetella*

Test	<i>B. bronchiseptica</i>		<i>B. pertussis</i>		<i>B. parapertussis</i>		<i>B. holmesii</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. trematum</i>	<i>B. avium</i>
	Phase I	Phase IV	Phase I	Phase IV	Phase I	Phase IV				
Hémolyse	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Croissance BGS	+ (1-2j)		+ (3-4j)		+ (2-3j)		+ (2j)	+ (1j)	+	+ (1j)
Croissance MacConkey	+		-	+	+		+	+	+	+
Oxydase	+		+		-	-	-	+	-	+
Uréase	+		-		+		-	-	-	-
Nitrate réductase	+		-		-	-	-	-	+/- (faible)	-
Utilisation du citrate	+/- (faible)		-		-	-	-	+	+	+/- (faible)
Arginine dihydrolase	+/-		+/-		-	-	-	+	-	+/-
Ornithine décarboxylase	-		-		-	-	-	+	-	-
Acidification carbohydrates	-		-		-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Pigments	sans		sans		brun		brun	sans	jaunâtre	sans
G + C %	68.2-69.5		67.7-68.9		68.1-69		61.5-62.3	66-67	64-65	61.6-62.6

- les bactéries en phase III ou phase intermédiaire. Les colonies sont de taille moyenne (1 à 2 mm), lisses, opaques-translucides, convexes et non hémolytiques. Ces bactéries prennent un aspect en bâtonnet allongé et ont perdu leur virulence.

- les bactéries en phase IV. Elles correspondent à des colonies R de grande taille (>2mm) rugueuses, surélevées au centre et avec une marge ondulée, translucides et non hémolytiques. Ces bactéries sont mobiles, ont une croissance beaucoup plus rapide, ne synthétisent plus un grand nombre de facteurs exprimés en phase I et sont avirulentes.

4. Caractères biochimiques

BBS présente un certain nombre de caractéristiques permettant son identification. Comme pour les autres espèces du genre, les tests physiologiques suivants sont invariablement négatifs : hydrolyse de la gélatine, de l'esculine, de la caséine, de l'amidon, fermentation oxydative des glucides, capacité à croître en anaérobiose, production d'indole et présence d'une phosphatase (Pittmann, 1984).

Les caractères biochimiques positifs chez *BBS* sont légèrement plus nombreux que chez les autres espèces de *Bordetella*, malgré l'inertie sur les glucides. Cette bactérie hydrolyse l'urée, utilise l'asparagine. Elle possède également une catalase, une peroxydase et une lysine décarboxylase.

Tout comme *BP* et *BA*, *BBS* produit une cytochrome oxydase. Elle est capable de réduire les nitrates en nitrites (Goodnow, 1980). Cependant, il arrive que la recherche de la nitrate-réductase reste négative, sa production semblant être inconstante chez *BBS* (Bemis *et al.*, 1977).

BBS a la capacité de pousser sur un milieu contenant du citrate. Le milieu le plus utilisé est le milieu de Simmons dans lequel la source de carbone est représentée par le citrate trisodique.

Les principaux caractères biochimiques permettant d'identifier *BBS* sont résumés dans le tableau 2.

5. Le genre *Bordetella* et les autres genres

5.1. Le genre *Alcaligenes*

C'est entre les bactéries du genre *Alcaligenes* et *BBS* que les plus grandes confusions ont été faites. Les bactéries du genre *Alcaligenes* sont des coccobacilles à gram négatif ubiquitaires, opportunistes. Elles semblent dépourvues de tout pouvoir pathogène naturel pour l'homme.

Le tableau 2 différencie *BBS* de *Alcaligenes faecalis* et de *Alcaligenes denitrificans*. *BBS* s'en distingue par son importante activité uréasique (Pittman, 1984).

5.2. Groupe IVc-2 et IVe

BBS présente un certain nombre de propriétés communes avec les souches dénommées "*BBS-like*" par Hinz *et al.* (1978) et rassemblées dans les groupes IVc-2 et IVe par le CDC. Ces deux groupes rassemblent des bactéries à gram négatif possédant une importante activité uréasique.

Le groupe IVc-2 ne réduit pas les nitrates en nitrites, alors que le groupe IVe peut réduire les nitrates en nitrite jusqu'au stade azote. Leur différenciation se fait notamment sur l'étude de réactions d'alcalinisation (Kerstens *et al.*, 1984) (Tableau 3).

Tableau 3. Différenciation entre *Bordetella bronchiseptica* et des espèces phénotypiquement semblables

Test	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>A. denitrificans</i>	Groupe CDC IV e-2	Groupe CDC IV c-2
Mobilité	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+
Uréase	+	-	variable	+	+
Réduction des nitrates en nitrites	+	-	+	+	-
Production d'azote à partir des nitrates	-	-	+	+	-
Production d'azote à partir des nitrites	-	+	variable	+	-
Acidification du fructose	-	-	-	-	-
Alcalinisation des substrat suivants :					
- acétamide	-	+ ou -	+	-	-
- arginine	-	-	-	-	-
- histidine	-	+ ou -	+	-	+
- saccharate	+	-	+	-	+
G + C %	68.2 – 69.5	55.9 – 59.4	63.9- 68.9	46.4 - 46	65.9 – 67.3

6. Les supports moléculaires du pouvoir pathogène : adhésines et toxines.

L'infection des voies aériennes par *BBS* est caractérisée par une phase d'adhésion des bactéries, puis une phase de multiplication avec libération de toxines. Plusieurs facteurs impliqués dans la pathogénie ont été caractérisés, les uns destinés à l'adhésion, les autres à contrer les défenses immunitaires de l'hôte.

6.1. Les adhésines

Durant la phase initiale de colonisation, les adhésines permettent à *BBS* de se lier spécifiquement à la surface des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. Outre son tropisme pour les épithélium trachéaux et bronchiques, *BBS* peut se fixer à d'autres types cellulaires tels que les macrophages alvéolaires (Zelig *et al.*, 1986), les cellules dendritiques (Guzman *et al.*, 1994a) et différentes lignées de cellules épithéliales non ciliées (Schipper *et al.*, 1994 ; Savelkoul, 1992).

A la différence des bactéries en phase I, les bactéries en phase IV sont incapables d'adhérer aux cellules épithéliales ciliées (Chung *et al.*, 1990).

6.1.1. Les fimbriae

Les fimbriae (Fim) ou agglutinogènes (AGG) synthétisés par les espèces *BP*, *BPP* et *BBS* sont définis comme des protéines générant des anticorps capables d'agglutiner les bactéries. Ces longs filaments sont impliqués dans l'attachement de nombreuses espèces bactériennes aux cellules de l'hôte et pourraient jouer le même rôle chez les *Bordetella*.

Chez *BBS*, trois types de fimbriae ont été caractérisés et dénommés Fim2, Fim3 et FimX (Savelkoul, 1992). Ils sont exprimés par les colonies en phase I et en phase intermédiaire de *BBS* alors que les colonies en phase IV ne les expriment pas (Lee *et al.*, 1986).

Les fimbriae pourraient également jouer un rôle dans la spécificité de l'hôte infecté par *BBS* (Burns *et al.*, 1993).

6.1.2. L'hémagglutinine filamenteuse

L'hémagglutinine filamenteuse ou FHA (Filamentous Hemagglutinin Antigen) est une protéine hydrophobe sécrétée par les bactéries en phase I dans le milieu de culture sous la forme de filaments (Chung *et al.*, 1990). Elle a la propriété de se fixer aux hématies de différentes espèces animales et de provoquer leur agglutination (Keogh *et al.*, 1947).

La FHA possède de nombreux sites capables de reconnaître des récepteurs cellulaires tels que les glycoprotéines des cellules ciliées et les intégrines des lymphocytes et des macrophages.

La FHA de *BP* est un antigène induisant une immunité protectrice contre l'infection par *BP* dans le modèle murin (Kimura *et al.*, 1990). Elle entre dans la composition des vaccins coquelucheux acellulaires actuellement utilisés (Guiso *et al.*, 1994).

6.1.3. La pertactine

La pertactine (PRN) est une protéine de la membrane externe synthétisée par les souches en phase I de *BBS*.

La PRN de *BP* semble impliquée dans l'adhésion de la bactérie sur les macrophages (Leininger *et al.*, 1991). Elle favoriserait également l'action de la FHA qui, en absence de la pertactine, est exposée à la surface des bactéries dans une conformation inactive (Arico *et al.*, 1993).

Kobish et Novotny (1990) ont montré que la vaccination de truies gestantes avec la PRN purifiée de *BBS* protège les nouveau-nés de certaines manifestations cliniques induites par une

infection expérimentale avec *BBS*, parmi lesquelles la rhinite atrophique et la colonisation bactérienne des poumons. La vaccination ne modifie cependant pas le portage au niveau nasal. La PRN entre actuellement dans la composition de certains vaccins coquelucheux acellulaires.

6.2. Les toxines

BBS produit plusieurs toxines possédant des activités biologiques diverses.

6.2.1. La toxine dermonécrotique

Les espèces *BP*, *BPP*, *BA* et *BBS* ainsi que *Pasteurella multocida* (bacille à gram négatif génétiquement proche des *Bordetella* et partageant souvent la même niche écologique) produisent une toxine dermonécrotique (TDN). Elle est synthétisée dans le cytoplasme des *Bordetella* en phase I.

Les toxines purifiées de *BBS* et de *Pasteurella multocida* présentent un certain nombre de propriétés biologiques communes aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Ces toxines provoquent des lésions nécrotiques au niveau du derme lorsqu'elles sont injectées par voie sous cutanée. L'administration par cette voie à des souriceaux nouveau-nés induit une vasoconstriction irréversible des vaisseaux sanguins périphériques de la face interne de la peau (Endoh *et al.*, 1986b). Il existe un parallèle entre l'âge des animaux et la sévérité des lésions observées, les souriceaux étant plus sensibles à l'action de la toxine que les adultes (Parton, 1986).

Elles induisent également d'importantes altérations osseuses. La TDN diminue l'activité de la phosphatase alcaline et l'accumulation du collagène de type I, deux éléments essentiels pour la différenciation des cellules ostéoblastiques. Il en résulte une diminution du renouvellement de la matrice osseuse (Horiguchi *et al.*, 1991). Ce mécanisme intervient probablement dans la pathogénie de la rhinite atrophique du porc.

La TDN pourrait également jouer un rôle dans la survenue de pneumonies chez les porcelets en contribuant à la paralysie des cils de l'épithélium bronchique (Goodnow, 1980).

6.2.2. La toxine cytotrachéale

La toxine cytotrachéale (TCT) est une toxine sécrétée de façon constitutive par les *Bordetella*. Elle est responsable de la destruction des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire au cours de l'infection. Des biopsies de tissu respiratoire humain prélevées au niveau des voies nasales et traitées *in vitro* à la TCT présentent une cytopathologie comparable à celle des patients infectés par *BP*. Les cellules ciliées et non ciliées sont progressivement détruites et l'activité ciliaire des cellules survivantes est inhibée (Wilson *et al.*, 1991).

La TCT et un autre constituant de la membrane externe de *BBS*, le lipopolysaccharide, pourraient avoir un effet synergique au cours de la destruction de l'épithélium respiratoire (Flack and Goldman, 1999).

La TCT est difficile à purifier et non immunogène. Pour ces raisons et malgré son rôle central dans la maladie, elle ne peut être incluse dans les nouveaux vaccins.

6.2.3. L'adénylcyclase-hémolysine

L'adénylcyclase-hémolysine (AC-Hly) est une protéine synthétisée et sécrétée dans le milieu extracellulaire par les souches virulentes de *BP*, *BPP* et *BBS* en début de la phase exponentielle de croissance.

L'AC-Hly de *BP*, de *BPP* et de *BBS* possède trois propriétés majeures : une activité adénylcyclase (transformation d'ATP en AMPc) stimulée par la calmoduline, une activité hémolytique calcium dépendante et une activité invasive pour plusieurs types de cellules

eucaryotes. Ces trois activités sont structurellement et fonctionnellement indépendantes (Sakamoto *et al.*, 1992 ; Betsou *et al.*, 1995a).

L'AC-Hly pénètre à l'intérieur des cellules eucaryotes où, après activation par la calmoduline endogène, elle catalyse la synthèse de hauts niveaux d'AMPc qui perturbent la physiologie cellulaire (Gordon *et al.*, 1989).

Les effets physiopathologiques de l'AC-Hly *in vivo* ont été montrés à l'aide de mutants déficients dans la production de la toxine. Dans un modèle murin d'infection létale, ces mutants sont avirulents (Weiss *et al.*, 1984 ; Khelef *et al.*, 1994).

In vitro, Khelef *et al.* ont mis en évidence le rôle de l'AC-Hly dans l'induction du phénomène d'apoptose des macrophages alvéolaires (Khelef *et al.*, 1993). Ce phénomène a été confirmé *in vivo*, à l'aide d'un modèle murin d'infection respiratoire (Gueirard *et al.*, 1998). L'AC-Hly joue un rôle essentiel dans la colonisation du tractus respiratoire par *BBS*, vraisemblablement en détruisant la première ligne de défense de l'hôte que sont les macrophages alvéolaires (Khelef, 1993 ; Gueirard, 1998).

Des expériences d'immunisation passives et actives (Guiso *et al.*, 1989 ; Guiso *et al.*, 1990 ; Guiso *et al.*, 1991) menées dans un modèle murin d'infection respiratoire montrent que l'AC-Hly est immunogène et qu'elle est un antigène induisant une immunité protectrice.

6.2.4. Le lipopolysaccharide

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des constituants majeurs de la membrane externe des bactéries à gram négatif. Le LPS des *Bordetella* possède certains domaines communs à tous les LPS des autres espèces bactériennes tels que le lipide A et le noyau polysaccharidique de base ou « core polysaccharide ». A la région du core sont généralement rattachés un nombre variable d'unités répétitives oligosaccharidiques portant la spécificité antigénique « 0 ».

In vivo, le LPS de *BP* possède les mêmes activités que les autres endotoxines bactériennes parmi lesquelles la capacité de stimuler une protection "non spécifique" contre les infections bactériennes, la mitogénicité pour les cellules B et l'induction de l'activité polyclonale de lymphocytes (Chaby *et al.*, 1988). Il est toxique, pyrogène et peut provoquer une diminution de la pression artérielle conduisant au choc létal lorsqu'il est administré par voie intraveineuse.

Le LPS pourrait agir en synergie avec la TCT (Flak and Goldman, 1999).

6.2.5. La toxine de pertussis

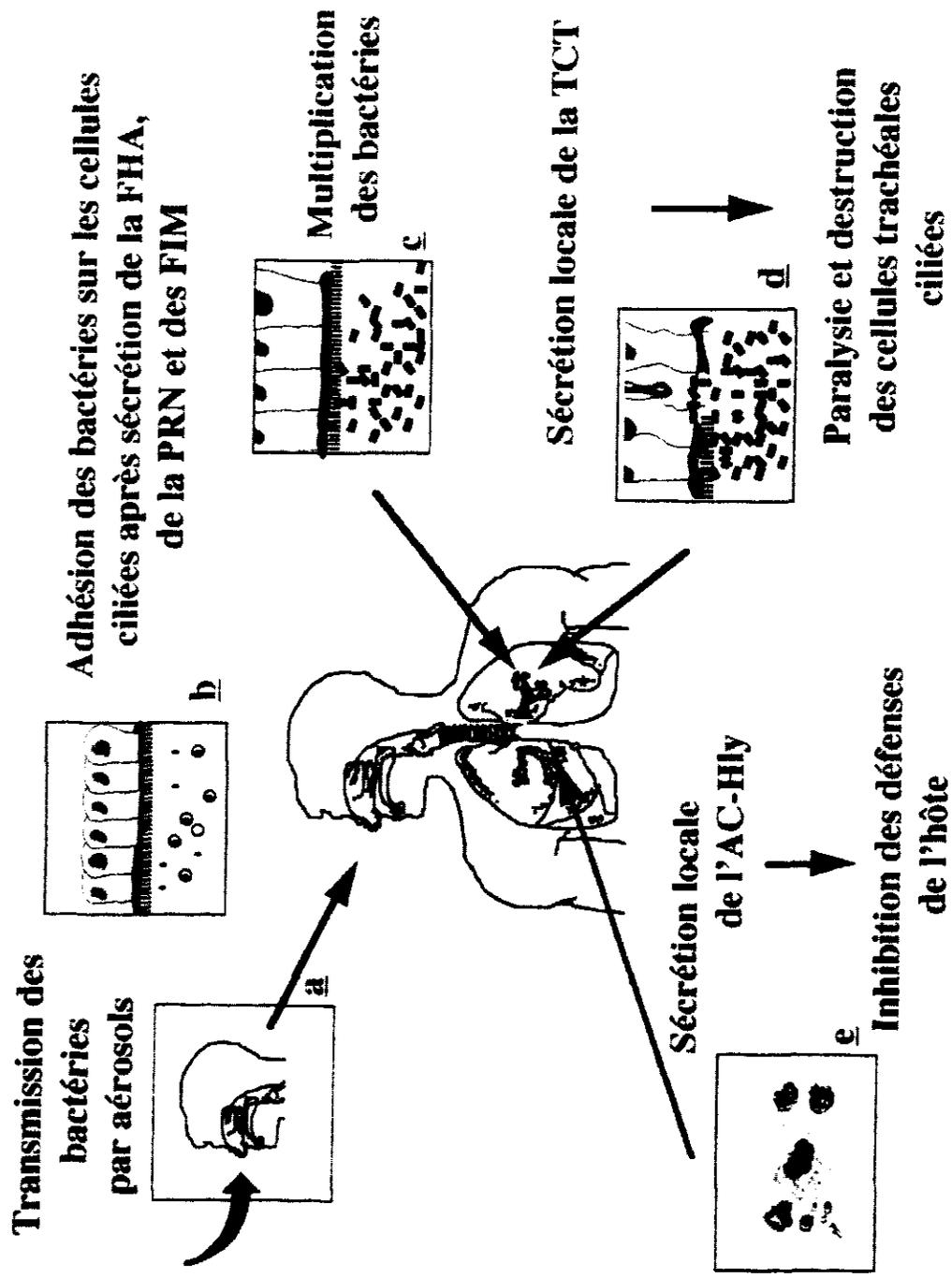
La toxine de pertussis (PT) est spécifiquement exprimée par les souches en phase I de *BP* mais pas par les autres espèces *BPP*, *BA* et *BBS*.

Des expériences d'hybridation à l'aide d'une sonde spécifique des gènes de structure de la PT ont permis de montrer que *BBS* possède des gènes similaires à ceux de la PT. Ces gènes ne sont pas transcrits car des mutations situées dans leur promoteur les rendent inactifs (Gross *et al.*, 1989a). Placés sous le contrôle du promoteur de *BP*, ces gènes s'expriment indiquant qu'en présence d'un promoteur fonctionnel la toxine pourrait être active chez *BBS* (Arico *et al.*, 1987b).

6.2.6. Le système de sécrétion de type III

Yuk *et al.* (1998) ont identifié chez *BBS* un gène codant pour le système de sécrétion de type III. Ce gène, nommé *bsc*, synthétise une protéine qui intervient au niveau de la régulation de la sécrétion de peptides de faible poids moléculaire dont le rôle reste à déterminer. Dans un modèle murin d'infection respiratoire, Yuk *et al.* ont mis en évidence l'implication de cette protéine dans des mécanismes rendant *BBS* cytotoxique pour les cellules de mammifère. Par

Figure 2. Coopération des déterminants de virulence



ailleurs, le système de sécrétion de type III ne serait pas impliqué dans la capacité des bactéries à coloniser l'appareil respiratoire, mais dans leur persistance.

Notion de coopération des déterminants de virulence : les adhésines et les toxines sécrétées par *BP* agissent en synergie au cours de l'infection (Figure 2).

- En absence de PRN, la présentation de la FHA à la surface des bactéries est médiocre (Arico *et al.*, 1993).

- La FHA et l'AC-Hly agiraient en synergie pour inhiber les fonctions des monocytes (Boschwitz *et al.*, 1997).

- L'effet conjugué de la TCT et du LPS sur la production de l'IL-1 permettrait une destruction rapide des cellules trachéales ciliées (Flak and Goldman, 1999).

Mis à part la toxine PT, *BBS* possède les mêmes facteurs de virulence que *BP* et il est permis de supposer que des mécanismes de coopération semblables à ceux décrits pour *BP* existent chez *BBS*.

6.3. Le flagelle

Le rôle joué par le flagelle dans l'infection par *BBS* reste encore à démontrer. Il pourrait néanmoins permettre le déplacement de la bactérie vers des niches écologiques favorables et favoriser l'adhésion aux cellules eucaryotes, comme cela a été montré *in vitro* sur des cellules Hela (Savelkoul, 1992).

6.4. L'uréase

Un mutant uréase négatif colonise la trachée, les poumons et le caecum de cobayes de façon comparable à une souche sauvage uréase positive, indiquant que l'uréase n'est pas essentielle pour la colonisation du tractus respiratoire et digestif de cobayes infectés par *BBS*. Par contre, l'uréase pourrait être nécessaire à la bactérie pour la survie dans l'environnement, peut être pour la décomposition de l'urée en azote dans un environnement nutritionnel limité ou pour la protection contre un environnement acide (Monack and Falkow, 1993).

7. Régulation de l'expression des facteurs de virulence

La régulation de ses facteurs de virulence permet à *BBS* de coloniser et d'infecter le tractus respiratoire puis d'y survivre en échappant aux mécanismes de défense de l'hôte.

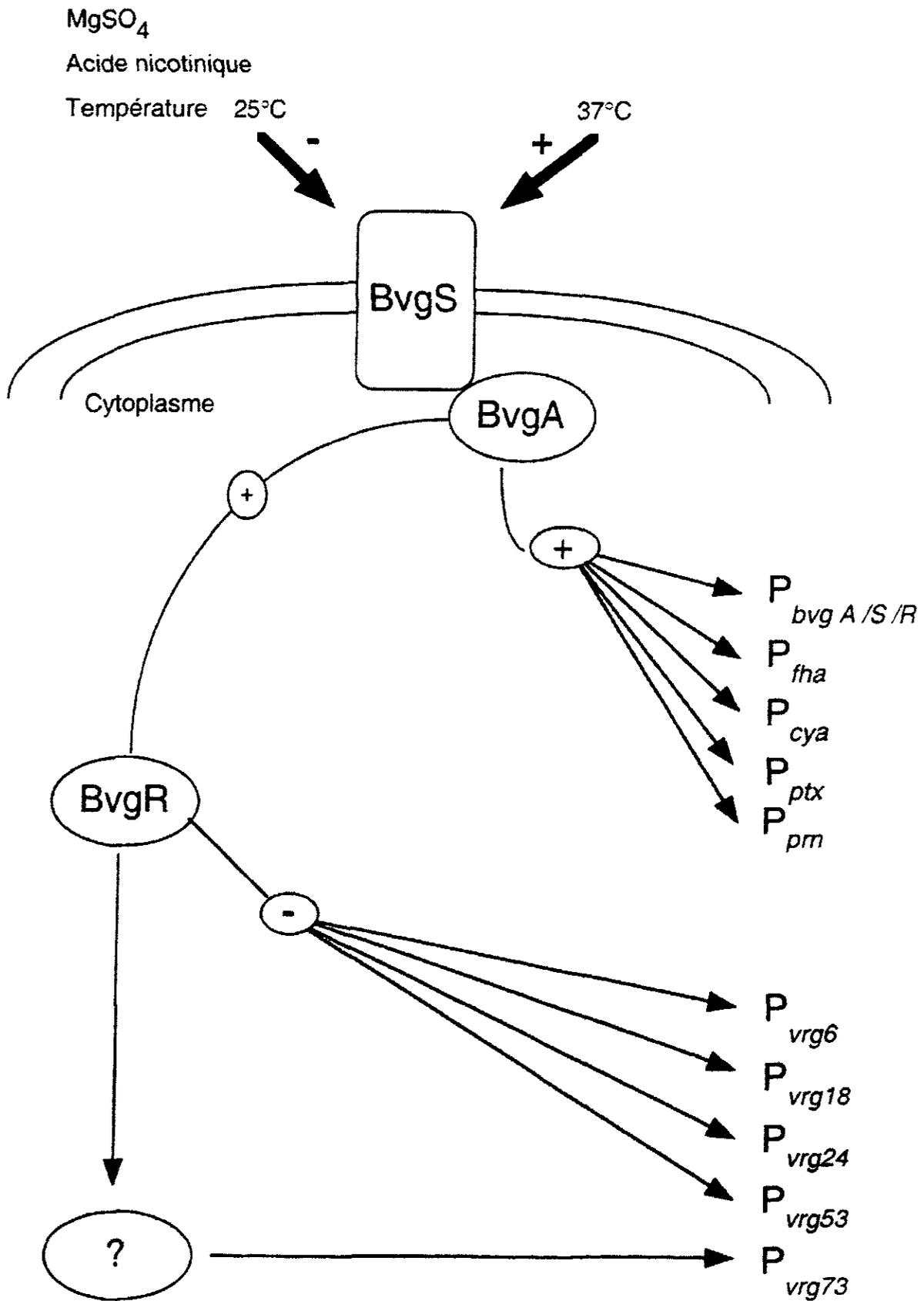
Au cours de l'évolution d'un état virulent vers un état avirulent, l'expression de plusieurs facteurs de virulence (Fim2, Fim3, FHA, PRN, AC-Hly et TDN) est abolie, à l'exception de la TCT qui est synthétisée de façon constitutive. Ce phénomène est la conséquence de deux types de mécanismes représentés par la variation de phase et la modulation antigénique. Ces deux mécanismes régulateurs sont sous le contrôle du système *bvg* (*Bordetella* virulence gene ou gènes *vir*) à deux composants.

7.1. Le système *bvg*

Le locus *bvg* comprend deux gènes *bvgA* et *bvgS* codant pour deux protéines, BvgA, protéine cytoplasmique et BvgS, protéine transmembranaire (Figure 3).

Ces deux protéines forment un système qui régule de façon coordonnée l'expression des facteurs de virulence chez l'agent pathogène en réponse à des stimuli extérieurs physiques ou chimiques tels que la température, l'osmolarité, le pH, certains sucres ou acides aminés... La protéine senseur BvgS, localisée dans la membrane bactérienne, perçoit les signaux extérieurs et les transmet à la protéine régulatrice BvgA, localisée dans le cytoplasme. La protéine BvgA

Figure 3. Modèle de régulation de l'expression des gènes par le système BvgAS



D'après Merkel, 1995

se fixe au niveau des promoteurs des gènes *vag* (*vir activated genes*) codant les facteurs de virulence et active leur transcription (Stibitz and Yang, 1991).

BvgA active également la transcription du gène *bvgR*. Ce gène code pour la protéine BvgR qui inhibe la transcription des gènes *vrg* (*vir repressed genes*) (Uhl and Miller, 1996). Les produits des gènes *vrg* ne seraient pas nécessaires pour initier la maladie. Ils seraient exprimés à un taux élevé au cours des phases silencieuses de l'infection et permettraient à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte tout en prolongeant la colonisation (Merkel *et al.*, 1998).

7.2. La variation de phase

La variation de phase représente un des deux mécanismes régulateurs sous le contrôle du système *bvg*. Il correspond à la transformation de *BBS* d'un état en phase I à un état en phase IV.

Lors de la classification phénotypique des variants de phase en fonction de l'expression de trois facteurs, seuls quatre groupes phénotypiques, parmi les huit possibles ont pu être caractérisés chez *BP* (AC-Hly+ PT+ FHA+, AC-Hly- PT+ FHA+, AC-Hly- PT- FHA+, AC-Hly- PT- FHA-) suggérant l'existence d'un mécanisme graduel de régulation de l'expression des facteurs, avec une disparition des facteurs de virulence en plusieurs étapes et dans l'ordre suivant : AC-Hly, PT et FHA (Goldman *et al.*, 1984).

La variation de phase est due à une mutation de l'un des deux gènes *bvgA* ou *bvgS*.

Lors de cultures successives de *Bordetella*, des mutants spontanés peuvent être isolés. Par ailleurs, l'obtention de mutants phase IV peut se produire spontanément à une fréquence de 10^{-3} pour *BBS*. L'obtention de révertants ne survient qu'à une fréquence de 10^{-10} .

7.3. La modulation antigénique

Le second mécanisme régulateur sous le contrôle du système *bvg* est représenté par la modulation antigénique. Ce phénomène ne correspond pas à une modification génotypique comme dans le cas de la variation de phase, mais à une modification phénotypique au cours de laquelle l'expression de différents facteurs de virulence de *BBS* est inhibée de façon coordonnée, en réponse à des signaux extérieurs tels que la température, l'acide nicotinique, les ions SO_4^{2-} et ClO_4^- , la concentration saline, les acides gras (Melton and Weiss, 1989). Ce phénomène est parfaitement réversible et le niveau de synthèse des différentes protéines est restauré lorsque les signaux modulateurs sont éliminés du milieu de culture.

La variation de phase et la modulation pourraient constituer un moyen de survie pour les bactéries. Cela leur permettrait d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte en raison des modifications antigéniques qui y sont associées. Cela pourrait également favoriser le portage asymptomatique et la constitution de réservoirs jusqu'à ce que les bactéries puissent retrouver leur état pathogène. Enfin, Ishikawa a montré que les deux phénomènes entraînent une diminution de la sensibilité de *BBS* à l'égard de certains antibiotiques comme l'ampicilline, l'érythromycine et le chloramphénicol avec des concentrations minimales inhibitrices multipliées par 4 à 32 fois (Ishikawa *et al.*, 1988).

7.4. Autres mécanismes de régulation

7.4.1. La protéine BTR

Le gène *btr*, cloné chez *BP* (Bannan, 1993), est un homologue du gène *fnr* de *E. coli*, dont le produit contrôle l'expression des gènes impliqués dans la croissance en condition d'anaérobiose (Choe, 1991). La protéine BTR codée par ce gène pourrait réguler, en fonction des modifications du taux d'oxygène et du potentiel rédox (surface de l'épithélium bronchique

/ intérieur d'une vacuole de phagocytose), l'expression de gènes nécessaires à la virulence ou à la survie (Bannan, 1993). L'expression du gène *btr* n'est pas régulée par le système *bvg*. Une protéine semblable à la protéine BTR a été mise en évidence chez *BBS*.

7.4.2. La régulation par le fer

La plupart des bactéries pathogènes ont développé des systèmes de captation et de transport spécifiques du fer leur permettant d'acquérir cet élément essentiel à leur croissance à l'intérieur de l'hôte. Le fer est rarement présent sous forme libre dans l'organisme et cette capacité est donc un facteur déterminant dans l'établissement de la pathogénicité.

Le fer extracellulaire se trouve complexé à la transferrine dans le sérum ou à la lactoferrine au niveau des surfaces muco-sales. En réponse à une infection bactérienne, les cellules de l'hôte maintiennent un niveau de fer très bas grâce à l'action de ces deux protéines.

BP semble avoir développé deux mécanismes pour palier à la faible quantité en fer qui est à sa disposition dans les voies respiratoires de l'hôte. Lorsque la concentration en fer est limitante, *BP* sécrète *in vitro* un sidérophore, molécule capable de chélater avec une forte affinité le fer complexé à d'autres protéines et le transporter vers la bactérie. D'autre part, *BBS* produit des protéines de membrane externe qui se lient directement et de façon spécifique à la lactoferrine ou à la transferrine, permettant ainsi le transport du fer à l'intérieur de la bactérie. L'action du fer dans la régulation de l'expression des déterminants de virulence chez les bordetelles n'est pas parfaitement établie mais il a été démontré qu'une carence en fer induisait des modifications dans l'expression de certains facteurs tels que la PT ou le LPS, sans modification de l'expression ni de la PRN, ni de la TDN (Agiato, 1992).

Conclusion

Le système de régulation le plus étudié est le système majeur de régulation à deux composants *bvg*, mais les conditions dans lesquelles cette modulation intervient *in vivo* restent inconnues. Plus d'une quinzaine d'autres systèmes de régulation ont été mis en évidence chez *BP* durant les dix dernières années. Certains de ces systèmes tels que la régulation par le fer ou le système *btr* pourraient intervenir dans la survie intracellulaire (Mahon et Mills, 1999). Le rôle exact de tous les déterminants ainsi que l'imbrication des systèmes de régulation au cours de l'infection reste à préciser. Il est probable que de tels systèmes de régulation existent chez *BBS*.

III. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET TYPAGE

1. Diagnostic biologique

1.1. Culture

Le diagnostic de l'infection par *BBS* est avant tout un diagnostic bactériologique à partir de prélèvements nasopharyngés ou trachéobronchiques. *BBS* a pu être isolée à partir d'autres produits biologiques tels que le liquide céphalo-rachidien, le liquide péritonéal ou les tissus hépatique et splénique, mais ces prélèvements constituent des sites exceptionnels d'isolement de la bactérie.

BBS est de culture aisée et rapide dans les 24 à 48 heures sur des milieux ordinaires, sur le milieu de Mac Conkey qui contient des sels biliaires capables d'inhiber la croissance de certaines espèces de bactéries à gram positif ou sur d'autres milieux sélectifs. Le milieu de

Bordet-Gengou (sensibilité inférieure à 50 %) à base d'extrait de pomme de terre et de sang (BGS) permet de visualiser le halo d'hémolyse autour des colonies. Il est recommandé d'utiliser deux milieux, sélectif et non sélectif, en raison, d'une part, de la flore bactérienne préexistante dans les prélèvements et, d'autre part, de l'inhibition de croissance de certains isolats de *BBS* par les antibiotiques.

Les techniques d'identification des isolats de *BBS* sont phénotypiques et biochimiques. L'aspect des colonies sur milieu Bordet-Gengou et les caractères biochimiques permettant de différencier *BBS* de *BP*, de *BPP* et d'espèces phénotypiquement semblables ont été décrit préalablement dans les caractères bactériologiques (cf § II).

1.2. Amplification génique

Différentes techniques de diagnostic par amplification génique (PCR ou Polymérase Chain Reaction) ont été utilisées ces dernières années pour détecter directement l'ADN des Bordetelles à partir du prélèvement.

Une PCR spécifique de *BBS* a été mise au point dans le Laboratoire de Référence des Bordetelles à l'Institut Pasteur. *BBS* est la seule des trois espèces à posséder, dans certaines conditions, un flagelle. *BP* et *BPP* possèdent également le gène de structure du flagelle mais il ne s'exprime pas, probablement à cause d'une mutation située dans la région amont du gène. Le choix de l'amorce s'est donc porté sur la séquence nucléotidique se trouvant en amont du gène de structure du flagelle (Hozbor *et al.*, 1999).

Les premiers résultats ont montré une sensibilité supérieure à celle de la culture. Sur un échantillon provenant d'une patiente atteinte de bronchite et infectée au contact de ses lapins (Gueirard *et al.*, 1995), la PCR a donné un résultat positif alors que la culture est restée négative. Dans le modèle murin d'infection respiratoire : des souris infectées par des doses sublétales de *BBS* ont été sacrifiées à intervalles réguliers et les poumons prélevés afin de déterminer la persistance de la bactérie. Le tissu pulmonaire a été conjointement mis en culture et soumis à la PCR. Alors que la culture ne permettait d'isoler *BBS* que jusqu'à 35 jours après l'infection, la PCR détectait l'ADN bactérien jusqu'à 149 jours après l'infection (Hozbor *et al.*, 1999).

La PCR est une technique très spécifique et elle a une sensibilité supérieure à celle de la culture. Elle pourrait être utilisée pour étudier l'incidence des infections à *BBS* et pour suivre la persistance de la bactérie chez un malade. Dans l'hypothèse d'une localisation intracellulaire de *BBS*, les méthodes conventionnelles (culture et sérologie) pourraient ne pas être suffisamment sensibles pour dépister les sujets porteurs sains ou infectés chroniques.

1.3. Sérologie

Les diagnostics sérologiques sont rétrospectifs, ils nécessitent deux prélèvements réalisés à un minimum de 4 semaines d'intervalle pour mettre en évidence l'apparition d'anticorps spécifiques.

Les dosages immunoenzymatiques ou immunoempreintes utilisent des antigènes purifiés : la toxine pertussis, spécifique de *BP*, l'AC-Hly et la FHA exprimées à la fois par *BP* et *BPP*. Ce diagnostic est spécifique des *Bordetella* et permet de séparer *BPP* et *BBS* de *BP* mais ne permet pas de séparer *BPP* et *BBS* (Guiso *et al.*, 1993). Ces facteurs spécifiques ne sont cependant pas commercialisés et ces tests sont surtout utilisés lors d'enquêtes épidémiologiques ou d'essais cliniques. D'autre part, la purification est effectuée à partir de *BP*. On ne dispose pas pour l'instant d'antigènes purifiés de *BBS*.

2. Typage

Le typage permet d'identifier la souche incriminée dans une infection et de suivre son évolution dans l'espace et dans le temps. Il trouve son intérêt dans l'étude de la propagation intra ou interspécifique de la bactérie et de son évolution au cours du temps chez un même individu.

Les moyens de typage de *BBS* sont séparés en deux catégories (Weber, 1997) :

- Les méthodes phénotypiques basées sur la détection de caractères (biochimiques, immunologiques, résistance aux antibiotiques...) exprimés par la bactérie.
- Les méthodes génétiques basées sur l'analyse de l'ADN chromosomique ou extrachromosomique.

2.1. Techniques phénotypiques

2.1.1. Sérotypie

Le typage est basé sur les propriétés antigéniques spécifiques de la souche étudiée. La sérotypie, réalisable uniquement chez *BP*, est basée sur l'expression des fimbriae et du lipopolysaccharide (LPS) (Zhong, 1988).

2.1.2. Résistance aux agents antimicrobiens

Le typage est basé sur la résistance aux antibiotiques (antibiotype). Sa mise en œuvre est aisée mais le caractère souvent transitoire des résistances limite l'intérêt de cette technique.

2.1.3. Migration électrophorétique d'enzymes

Le polymorphisme des souches bactériennes est mis en évidence par une différence de migration électrophorétique d'enzymes hydrosolubles (Multilocus Enzyme Electrophoresis). Les mutations modifient la composition en acides aminés de l'enzyme et donc sa charge électrostatique dont dépend la migration.

L'analyse d'un grand nombre d'isolats de *BBS* (303) a permis de distinguer 21 électrotypes qui sont associés de façon spécifique avec certaines espèces hôtes (porcs, lapins...). Un même électrotype a été retrouvé chez des isolats provenant de la même espèce animale (porc) mais collecté dans des pays géographiquement éloignés (USA et Japon) (Musser *et al.*, 1987).

2.2. Techniques génétiques

Le typage met en évidence le polymorphisme au niveau de l'ADN. Une variation génétique n'étant pas systématiquement traduite en une variation phénotypique, il n'existe pas, a priori, de rapport entre un type génétique donné et son expression phénotypique.

Le typage peut être effectué par comparaison des fragments obtenus après restriction enzymatique du génome. Les sites de restriction ont une spécificité de 4 à 8 paires de bases ; le nombre de fragments obtenus dépend de l'enzyme utilisée. Les fragments sont séparés par migration sur gel d'agarose. La définition des types est basée sur l'identité des profils de migration.

2.2.1. Restriction à nombreux sites de coupure

Cette restriction va générer de nombreux fragments de taille réduite. La migration des fragments en gel d'agarose ne pose pas de problèmes techniques, mais les profils obtenus sont difficilement interprétables de par le nombre élevé de bandes (souvent impossible à distinguer au sein d'une trainée continue). Il est alors possible de réduire l'étude du polymorphisme à un fragment d'ADN particulier par l'utilisation d'une sonde. Ainsi, la ribotypie se fait selon le

profil de restriction des gènes ribosomiaux. Cette méthode de typage ne semble pas adaptée à l'étude de *BBS*.

2.2.2. Restriction avec un faible nombre de coupures et Electrophorèse en champ pulsé

Le nombre réduit de bandes (jusqu'à une trentaine) permet une comparaison exhaustive des fragments. Cependant, au-delà d'une taille voisine de 25 kilobases les fragments d'ADN ne peuvent pénétrer dans la réticulation d'un gel d'agarose sous leur forme globulaire. L'électrophorèse en champ pulsé (ECP) permet de séparer ces fragments d'ADN de grande taille. Par une variation cyclique de l'orientation des champs électriques appliqués sur le gel, les molécules d'ADN vont s'étirer puis se comprimer, l'alternance de ces mouvements conduit à un déplacement par reptation. La séparation des molécules est basée sur la différence de temps nécessaire à la réorientation des molécules d'ADN dans la direction du champ électrique. Ce temps de réorientation croît avec la taille des fragments. La durée d'application de chaque champ est appelée temps de pulsation.

Il existe de nombreuses variantes d'ECP en fonction de l'orientation des champs électriques. Cette technique s'est révélée très discriminante et tend à devenir une technique de référence. Le temps nécessaire à la préparation de l'ADN et à la migration ainsi que son coût la destine pour l'instant plus spécifiquement à des laboratoires spécialisés.

Conclusion

De toutes les techniques de typage, l'ECP est la plus adaptée à la comparaison des différents isolats de *BBS* (Weber, 1997). Les conclusions tirées du typage des bactéries par ECP doivent cependant être interprétées avec précaution. Récemment, Stibitz et Yang (1999) ont montré que des profils différents en ECP pouvaient ne pas être dus à un gain ou une perte de sites de restriction, mais plutôt à des inversions de séquences. Dans le cas de *BP*, l'établissement de ces inversions de séquences serait favorisé par la présence d'un nombre important de séquences d'insertion telles que l'IS481. Dans la mesure où la multiplication des sub-cultures des isolats peut favoriser l'établissement des recombinaisons génétiques, il est important de limiter leur nombre.

IV. POUVOIR PATHOGENE CHEZ L' ANIMAL

BBS est responsable d'affections respiratoires chez de nombreuses espèces animales domestiques et sauvages. Les animaux vivants en collectivités sont particulièrement exposés.

1. Implication de *Bordetella bronchiseptica* dans le syndrome de la toux de chénil

BBS est un agent pathogène majeur de la trachéobronchite infectieuse canine ou toux de chénil. Dans ce syndrome, elle est fréquemment associée au parainfluenzavirus canin et à l'adénovirus canin de type 2. D'autres organismes peuvent intervenir mais ont un rôle mineur : l'adénovirus canin de type 1, l'herpès virus canin, des réovirus, de nombreuses bactéries (*Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococci* bêta hémolytiques, *Klebsiella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium spp...*), des mycoplasmes...

Le rôle pathogène primaire de *BBS* a été contesté jusqu'aux travaux de Wright *et al.* en 1973 qui ont démontré que l'inoculation intra-nasale d'une culture de *BBS* entraînait chez des chiots une affection respiratoire associant toux et rhinorrhée. Ces travaux ont été confirmés par Thompson *et al.* en 1976.

Dans les conditions naturelles, la forme clinique de la maladie est déterminée par l'association des différents agents pathogènes ainsi que par les conditions de vie de l'animal :

- La forme simple est une trachéobronchite sèche caractérisée par une toux forte. L'état général est conservé et l'évolution favorable en une à trois semaines.

- La forme compliquée est une broncho-pneumonie qui survient d'emblée ou fait suite à la forme simple. Elle affecte le plus souvent des animaux jeunes (six semaines à six mois), non vaccinés contre la maladie de Carré et l'hépatite de Rubarth et hébergés dans des conditions d'hygiène précaires.

La morbidité est forte et la mortalité faible.

La pathogénie de l'infection à *BBS* chez le chien a été étudiée par Bémis *et al.* (1977). La bactérie, fixée sur les cils de l'épithélium respiratoire, est retrouvée à tous les niveaux du tractus respiratoire dotés d'un épithélium cilié (cavités nasales, trachée, bronches et bronchioles). La disparition de *BBS* de la surface de l'arbre trachéobronchique est relativement plus lente que celle des autres bactéries. Bémis l'isole jusqu'à quatorze semaines après une inoculation expérimentale.

BBS détermine également, bien que cela soit moins décrit, des troubles de la reproduction chez la chienne. Vaissaire (1989) décrit plusieurs cas survenus dans des chenils de reproducteurs : mises bas de chiots morts nés ou décès des chiots dans les deux à trois jours. Elle isole *BBS* en culture pure à partir de prélèvements provenant des chiots décédés ainsi que sur des écouvillons vaginaux et nasaux de chiennes ayant présenté une pathologie de la reproduction récente. La morbidité était de 30% dans l'élevage le plus atteint.

La toux de chenil est une des pathologies ayant l'impact économique le plus important dans les collectivités canines.

2. Infections respiratoires félines à *Bordetella bronchiseptica*

L'herpès virus félin et le calicivirus félin sont les principales causes de maladies respiratoires infectieuses chez le chat et le rôle pathogène exact de *BBS* est encore sujet à controverse. Longtemps considérée comme un agent secondaire, il semble cependant qu'elle puisse être, dans certaines conditions, un agent pathogène primaire.

2.1. Isolement de *Bordetella bronchiseptica* chez des chats présentant des affections respiratoires

BBS est isolée chez des chats atteints de bronchopneumonies (Mac Gowan, 1911 ; Fisk and Soaves, 1973 ; Willoughby, 1991 ; Welsh, 1996), chez des chats présentant une toux sèche sans atteinte de l'état général (Elliot, 1991 ; Welsh, 1996) et chez un chat de treize ans atteint d'un adénocarcinome de la muqueuse nasale (Welsh, 1996).

2.2. Reproduction expérimentale de la maladie

Jacobs parvient à reproduire la maladie chez des chats exempts d'organismes pathogènes spécifiques. Des chatons de huit semaines, soumis à un aérosol de *BBS*, développent des symptômes respiratoires (jetage nasal, éternuements, toux) en cinq jours. Les symptômes disparaissent en une dizaine de jours mais les chatons restent porteurs de la bactérie pendant au moins quatre semaines après la date d'infection (Jacobs *et al.*, 1993).

2.3. Prévalence

Fisk and Soaves (1973) ont étudié le portage de *BBS* chez des chats de laboratoire. A leur arrivée au laboratoire, 10% des chats étaient porteurs et trois semaines plus tard, *BBS* était isolée par écouvillonnage oropharyngé chez 48 % des chats.

Dans une étude sérologique pratiquée sur une population de chats tout venant, 72% des chats possédaient un taux élevé d'anticorps dirigés contre *BBS* (Mac Ardle, 1994). Les taux d'anticorps étaient plus élevés chez les chats vivants en collectivité et atteints d'infections respiratoires. La séroconversion se produisait chez les chatons entre sept et dix semaines d'âge.

Binns *et al.* (1999) ont mené une étude sur 740 chats afin de déterminer la prévalence des infections à *BBS* et les facteurs de risque prédisposant à ces infections. L'étude porte sur des chats sains ou atteints d'une affection respiratoire et vivants pour la plupart en collectivité. *BBS* est isolée par écouvillonnage oropharyngé ou nasal chez 11% des chats de l'échantillon.

La prévalence de l'infection varie en fonction du mode de vie des chats : 19,5 % en chatterie de refuge, 9 % en chatterie d'élevage, 13,5 % en animalerie de laboratoire et 0 % en maison individuelle. Dans le groupe des chats vivants en chatterie de refuge, *BBS* est isolée chez 40 % des chats atteints d'une infection respiratoire et chez 8 % des chats sains. Une recherche du calicivirus félin et de l'herpès virus est menée conjointement. Il n'y a pas d'association statistiquement significative entre l'isolement de *BBS* et l'isolement d'un virus chez le même chat. Ces données suggèrent que *BBS* pourrait être responsable de maladie respiratoire indépendamment de toute association avec un virus. Le taux d'isolement de *BBS* est significativement plus élevé chez les chats jeunes ainsi que chez les chats vivants en contact avec un chien ayant présenté récemment une infection respiratoire du type toux de chenil.

L'infection à *BBS* semble donc largement répandue dans certains groupes de chats, en particulier les chatteries de refuge ; le stress et le confinement pourraient être des facteurs favorisants.

2.4. Portage asymptomatique

Coutts *et al.* (1996) ont montré que des chats guéris d'une infection expérimentale à *BBS*, restaient porteurs de la bactérie pendant 19 semaines.

2.5. Contamination interspécifique

Le passage de *BBS* du chien vers le chat a été récemment mis en évidence (Dawson *et al.*, 2000). Un chiot atteint de toux de chenil est acheté par une famille possédant déjà un chien et deux chats. Le chien de la maison présente une semaine plus tard une toux qui durera un mois. Deux semaines plus tard, les deux chats présentent une toux accompagnée de fièvre et d'un écoulement nasal purulent. *BBS* est isolée chez les quatre animaux. Les profils en ECP des quatre isolats sont identiques. Ces observations semblent indiquer que le passage de *BBS* du chien vers le chat est possible.

Conclusion

Son isolement dans plusieurs cas spontanés de maladies respiratoires et la reproduction expérimentale de la maladie suggèrent que, dans certaines circonstances (jeune âge, mauvais état général, surpopulation), *BBS* puisse être un agent pathogène primaire chez le chat.

La clinique est polymorphe. Dans les formes bénignes, le chat présente les symptômes d'une infection des voies respiratoires supérieures avec des éternuements et un jetage oculo-nasal. Les bronchopneumonies associent fièvre, dyspnée, dépression et anorexie. Des formes

intermédiaires sont possibles. La toux est fréquemment décrite mais de manière moins systématique que chez le chien.

La bordetellose, évoluant seule ou en association avec des virus, est probablement sous estimée chez le chat parce que rarement recherchée.

3. Implication de *Bordetella bronchiseptica* dans le syndrome de la rhinite atrophique chez le porc

BBS est un des agents de la rhinite atrophique du porc. L'infection par *BBS* seule est à l'origine d'une forme non progressive et transitoire. L'association de *Pasteurella multocida* (*PM*) avec *BBS* donne une forme chronique, la rhinite atrophique progressive. La ciliostase et l'immunodépression résultant de l'infection par *BBS* favorise la colonisation de la muqueuse nasale par *PM* (Chanter *et al.*, 1989).

3.1. Clinique

3.1.1. Forme non progressive

L'infection par *BBS* se traduit par une rhinite avec hypoplasie des cornets nasaux atteignant des porcelets âgés de une à trois semaines. Les symptômes sont plus sévères chez les individus les plus jeunes. Plus rarement, une pneumonie survient chez les très jeunes porcelets. Les porcs atteints de rhinites non surinfectées guérissent généralement sans séquelles en quelques semaines.

3.1.2. Forme progressive

L'infection ou la surinfection par *PM* se traduit par une rhinite chronique caractérisée par une atrophie plus ou moins marquée des cornets nasaux et ethmoïdaux. Les lésions sont provoquées par l'absence de renouvellement de la matrice osseuse au niveau de la lame de soutien des cornets. Les TDN de *BBS* et de *PM* entraînent une dégénérescence des ostéoblastes associée à une augmentation de l'activité ostéoclastique (Magyar *et al.*, 1988).

3.2. Prévalence

Des études basées sur la mise en culture d'écouvillonnages nasaux chez des porcelets ont montré que 25 à 54 % des troupeaux (Ross *et al.* 1963 ; Harris *et al.* 1969) et 11 % des porcelets (Farrington and Switzer, 1977) étaient infectés par *BBS*. En général, les estimations basées sur des sérologies sont encore plus élevées (Jenkins *et al.*, 1977). Le portage asymptomatique est élevé.

4. Infections à *Bordetella bronchiseptica* chez les rongeurs et les lagomorphes

Le cobaye est particulièrement sensible à l'infection par *BBS*. Le tableau clinique associe rhinites, pneumonies et avortements. Des otites moyennes et internes sont également signalées. La mortalité est importante. Dans un élevage, la maladie évolue sur le mode enzootique avec de brusques poussées épizootiques. Le stress, le surpeuplement, la carence en vitamine C, des variations brutales de température, la dénutrition agissent comme facteurs prédisposants. Les femelles gestantes et les jeunes sont particulièrement exposés.

Le rat et la souris développent une bronchopneumonie aiguë à subaiguë. Le modèle d'infection par voie intranasale chez la souris est le modèle le plus fréquemment utilisé pour

déterminer la pathogénèse de l'infection par *BBS* ainsi que pour analyser l'immunité induite par les vaccins.

Chez le lapin, *BBS*, seule ou en synergie avec *PM*, est responsable de rhinites, d'otites et de bronchopneumonies. Une étude réalisée dans un élevage industriel (Deeb *et al.*, 1990) montre qu'à l'âge de deux mois, 75 % des lapereaux sont porteurs de *BBS* et 25 % de *PM*. Puis, la proportion des lapins infectés par *PM* augmente et à l'âge de quatre mois, environ 50 % des lapins infectés par *PM* seule ou associée à *BBS* présentent une atteinte des voies respiratoires supérieures alors que l'infection par *BBS* seule n'en entraîne pas. L'infection par *PM* semble favorisée par *BBS* et pérennise l'affection clinique.

5. Infections à *Bordetella bronchiseptica* chez le cheval

BBS n'est pas considérée comme un pathogène respiratoire fréquent des chevaux. Vandevienne *et al.* (1995), décrivent le cas d'un poulain de dix mois ayant déclaré une infection respiratoire dans les jours suivant une chirurgie effectuée sous anesthésie gazeuse. L'animal présente une tuméfaction des ganglions de l'auge, une toux grasse, un état fébrile (39,9°C) et un jetage nasal bilatéral séreux puis muco-purulent. Un écouvillonnage nasal permet d'isoler *BBS* chez le poulain ainsi que sur une jument présentant les mêmes symptômes et logée dans un box contigu. Il semble donc que *BBS* puisse intervenir chez le cheval comme agent infectieux primaire. Dans le cas de ce poulain, le stress chirurgical et l'anesthésie ont probablement favorisé le processus infectieux. Il est décrit dans la littérature qu'une anesthésie à l'halothane (qui inhibe l'action des cils) peut favoriser le développement d'une infection respiratoire à *BBS* (Bayly *et al.*, 1982).

Dans une série de 39 poulains atteints d'arthrite septique hémotogène, Poyade-Alvarado (1993) isole *BBS* dans un cas. Dans cette étude, les poulains étaient tous âgés de moins de deux mois, 20 % provenaient d'un poulinage anormal (dystocie, prématuré, placentite...), 72 % étaient atteints d'au moins une affection concomitante (pneumonie, omphalophlébite, diarrhée...). La fréquence élevée des infections néonatales et l'isolement d'organismes indigènes de l'hôte et de son environnement suggéraient l'existence de déficits dans l'immunité de ces poulains. Un manque total ou partiel de transfert passif des immunoglobulines à partir du colostrum de la jument fut démontré chez sept des douze poulains testés dans cette étude.

Il est possible que le nombre d'isolement de *BBS* relativement faible chez le cheval provienne de l'utilisation de milieux insuffisamment sélectifs envers les bactéries classiquement rencontrées dans les prélèvements (*Streptococcus zooepidemicus*, *Rhodococcus equi*, *E. coli*). Dans l'étude bactériologique des lavages bronchoalvéolaires, les milieux usuels sont envahis par *Streptococcus zooepidemicus* et les éventuelles colonies de *BBS* sont difficiles à identifier. L'utilisation de milieux sélectifs tel que le milieu de Bordet-Gengou additionné de pénicilline ou le milieu Chocolat-haemophilus a permis d'identifier *BBS* dans des cas où la culture sur gélose au sang était négative (Fortier, communication personnelle).

L'identification de *BBS* dans les affections respiratoires équinnes présente un intérêt thérapeutique certain. Les infections aiguës sont souvent graves chez le poulain et une antibiothérapie spécifique précoce est souvent décisive. *BBS* est résistante à de nombreux antibiotiques utilisés en première intention telles que les pénicillines et les antibiotiques actifs doivent être administrés pendant plusieurs semaines pour limiter les rechutes.

D'autre part, la pathogénie particulière de *BBS* incite à évaluer précisément son rôle dans les pathologies respiratoires chroniques. *BBS* persiste pendant très longtemps dans le tractus respiratoire, peut-être de manière intracellulaire. Cette persistance pourrait expliquer la

réurrence de certaines affections malgré des traitements adaptés. Le rôle de *BBS* dans les bronchopneumopathies obstructives chroniques est à évaluer. La stimulation persistante par les antigènes bactériens pourrait être une des cause de l'inflammation bronchique chronique observée dans ces pathologies.

6. Infections à *Bordetella bronchiseptica* chez les primates

BBS a été isolée chez des singes de laboratoire atteints de pneumonie. Dans l'espèce *Calicebus*, *BBS* serait responsable de 27 % des cas de bronchopneumonies (Goodnow, 1980). Klein (1987) l'isole en culture pure des poumons de cinq membres d'un groupe de huit singes verts africains (*Cercopithecus aethiops*) morts ou mourants de bronchopneumonie aiguë. La recherche d'une étiologie virale par culture et sérologie est négative. L'étude *in vitro* des cinq isolats montre qu'il s'agit probablement d'une même souche et que cette souche possède tous les facteurs de virulence connus. D'après ces observations, il semble que *BBS* puisse être un pathogène respiratoire primaire chez le singe vert africain.

7. Infections à *Bordetella bronchiseptica* dans la faune sauvage

Letcher *et al.* (1993) ont isolé *BBS* en culture pure des poumons d'un koala mâle décédé en l'espace de six heures d'une pneumonie suraiguë.

La rapidité d'évolution de cette pneumonie est retrouvée dans les deux descriptions suivantes et semble être la règle chez le koala.

Mac Kenzie *et al.* (1979) décrivent des épidémies récurrentes dans une colonie de koalas vivants en captivité en Australie. Lors de la première épidémie, la mortalité était de 13 % et la morbidité de 30 %. Lors des rechutes se produisant à chaque hiver, la mortalité avait chuté à 2 % et la morbidité à 15 %. Ces résurgences coïncidant avec le stress hivernal suggèrent un portage chronique chez certains individus dans la colonie.

Dans une réserve australienne, Canfiel *et al.* (1986) isolent *BBS* chez quatre koalas décédés d'une pneumonie. Trois des quatre koalas étaient par ailleurs atteints d'affections intercurrentes sévères.

Une enquête sur la prévalence de *BBS* dans la faune sauvage a été menée en Iowa (Switzer *et al.*, 1966). Les prélèvements ont été effectués par écouvillonnage trachéal sur des animaux tués à la chasse. *BBS* a été isolée chez 1 skunks sur 78 skunks testés, 2 opossums sur 105, 4 renards sur 108 et 3 raton-laveurs sur 85.

BBS a été isolée dans la trachée de 6 rats sur 21 capturés dans une décharge à ordures. Ce résultat implique que le rat pourrait être une source de contamination dans les porcheries.

Les cultures sont restées négatives chez 7 faucons, 7 hiboux, 45 faisans, 112 visons, 32 skunks tachetés et 54 coyotes.

Ces résultats démontrent la présence de *BBS* dans la faune sauvage.

Conclusion

Le rôle pathogène primaire de *BBS* est établi dans de nombreuses espèces. *BBS* évolue fréquemment en association avec d'autres agents bactériens ou viraux. Elle provoque une ciliostase et une immunodépression qui favorise les surinfections. Le jeune âge, un état général affaibli et la vie en collectivité sont des facteurs favorisants. Les études épidémiologiques sont fragmentaires mais il semble que la prévalence de *BBS* soit élevée

Tableau 4. Cas cliniques d'infections humaines à BBS (1)

Auteur	Sexe	Age	Pathologie sous-jacente	Clinique	Nature du prélèvement où BBS est isolé	Germes associés	Notion d'un contact animal
1) MAC GOWAN (1911)	M	?	?	Rhinite	Ecouvillonnage naso-pharyngé	Non	Contact avec des animaux de laboratoire (lapins et cobayes). BBS isolée dans un ECBE
2) FERRY (1917)	M	?	?	Syndrome pseudo-grippal	ECBE	Non	Contact avec des animaux de laboratoire (cobayes)
3) BROWN (1926)	M	5 ans	Non	Toux pseudo-coquelucheuse	ECBE	Non	BBS isolée dans un écouvillonnage nasal, à partir de tissu bronchique chez un lapin
4) CHANG (1950)	M	2 ans	Non	Toux pseudo-coquelucheuse	Ecouvillonnage naso-pharyngé	Non	Prélèvements naso-pharyngés négatifs chez le chien
5) JONES (1950)	?	?	?	Endocardite	?	?	?
6) KREPLER et FLAMM (1958)	M	14 ans	Non	Pneumopathie pseudo-tuberculeuse	ECBE	Non	?
7) WINSSER (1960)	M	Adulte	Non	Toux paroxysmale	ECBE	?	Animalier
8) WINSSER (1960)	?	?	?	Sinusite	Ponction de sinus maxillaire	?	?
9) DALE (1961)	M	60 ans	Non	Endocardite	Hémocultures	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	?

chez le chien, le porc et le lapin. La maladie est probablement sous diagnostiquée chez le chat et le cheval. L'existence d'un réservoir sauvage est vraisemblable.

V. POUVOIR PATHOGENE CHEZ L' HOMME

1. Fréquence de l'infection à *Bordetella bronchiseptica* chez l'homme

Fréquemment impliquée en tant que pathogène primaire ou secondaire dans des infections respiratoires chez l'animal, *BBS* n'a été que très rarement incriminée chez l'homme. Son rôle pathogène est pourtant évoqué dès les premières années de sa découverte. Mac Gowan (1911) et Ferry (1917) isolent la bactérie chez deux garçons animaliers atteints respectivement d'une rhinorrhée chronique et d'un syndrome grippal. Brown (1926) décrit à son tour le cas d'une enfant de cinq ans présentant des épisodes pseudo-coquelucheux et chez laquelle il identifie *BBS* dans les cultures d'un prélèvement d'expectoration.

Avant les travaux de Johnson et Sneath (1973) et de Bemis *et al.* (1977), les critères d'identification bactériologique manquaient de fiabilité, la confusion avec des bactéries de phénotype proche appartenant aux genres *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* et *Brucella* était possible. Les cas étant peu documentés, il est parfois difficile de déterminer si la bactérie isolée était effectivement *BBS* et si elle était la cause de la maladie ou simplement un commensal. La liste des cas référencés est exposée par ordre chronologique dans les tableaux 4 à 7.

A partir de 1980, le nombre de cas d'infection humaine à *BBS* semble augmenter de manière sensible. Il est probable que les progrès réalisés en médecine contribuent à cette augmentation. En bactériologie, l'identification des microorganismes fait appel actuellement à des galeries miniaturisées prêtes à l'emploi qui permettent d'obtenir des résultats aussi rapides et fiables pour des bactéries rares comme *BBS* que pour des bactéries plus courantes. En pneumologie, principal domaine des infections à *BBS*, les techniques de prélèvement des sécrétions trachéo-bronchiques sont devenues très performantes, qu'il s'agisse de l'aspiration transtrachéale, du brossage bronchique protégé distal ou du lavage bronchique, méthodes qui permettent de prélever le germe dans les voies respiratoires profondes en évitant la contamination par la flore oropharyngée. Les progrès effectués en thérapeutique rendent possible des survies prolongées chez des patients atteints de maladies graves et favorisent de ce fait l'apparition d'affections nouvelles par fragilisation du terrain.

De 1990 à 1995 est mis en place un réseau d'épidémiologie constitué par les Laboratoires du Collège de Bactériologie des Hôpitaux et d'autres Laboratoires Correspondants du Centre National de Référence (Le Coustumier *et al.*, 1995). Grâce à ce réseau, 52 cas ont pu être colligés alors que dans leur revue Woolfrey et Moody (1991) en répertorient seulement 25 cas sur la période 1911 à 1991.

2. Répartition dans la population et importance du terrain

Les infections à *BBS* se rencontrent essentiellement chez les personnes âgées, les patients immunodéprimés et, à un degré moindre, les enfants.

Elles semblent se développer préférentiellement sur les terrains fragilisés. Deux facteurs favorisants sont très fréquemment rencontrés :

Tableau 5. Cas cliniques d'infections humaines à *BBS* (2)

Auteur	Sexe	Age	Pathologie sous-jacente	Clinique	Nature du prélèvement où <i>BBS</i> est isolé	Germe associés	I. Notion d'un contact animal
10) KRISTENSEN (1962)	M	5 ans	Non	Toux atypique	Ecouvillonnages nasaux	Non	<i>BBS</i> isolée dans des prélèvements naso- pharyngés chez 2 chats
	M	6 ans	Non	Toux pseudo- coquelucheuse			
	M	8 ans	Non	Pas de symptôme			
	F	8 ans	Non				
	F	9 ans	Non				
	F	10 ans	Non				
11) BROOKSALER (1967)	M	12 ans	Non	Toux pseudo- coquelucheuse	?	?	Lapin domestique retrouvé mort
12) GARDNER (1970)	F	57 ans	Remplacement valvulaire aortique Absces péri-tonéal	Trachéo-bronchite	ECBE	?	Non
13) GARDNER (1970)	M	69 ans	Anémie hémolytique Thrombocytopenie Splénectomie	Pneumonie	Hémoculture	Pneumocoque	Non
14) SNEL (1973)	?	Adulte	?	Septicémie de type typhoïdique	Hémoculture	Non	?
15) CHANG (1975)	M	9 ans	Non	Méningite post- traumatique	Liquide céphalo- rachidien	Non	Absence de <i>BBS</i> dans les prélèvements nasaux des animaux de l'enfant
16) GHOSH (1979)	M	73 ans	Terrain alcoolique Dénutrition	Broncho- pneumonie bilatérale	Hémocultures Pus d'aspirations trachéales	Non	?
17) BYRD (1981)	M	60 ans	Insuffisance rénale chronique. Dialyse péritonéale ambulatoire continue	Péritonite	Liquide péritonéal	Non	Chien (pas de prélèvement)

- une affection pulmonaire préexistante : néoplasie bronchopulmonaire, bronchite chronique, asthme, brucellose, tuberculose...
- une immunodépression sévère : atteinte par le VIH, hémopathie, chimiothérapie, corticothérapie, éthyliste...

Ces données soulignent le caractère opportuniste de la bactérie.

Il n'est cependant pas exclu que *BBS* puisse se comporter comme un pathogène primaire dans la mesure où elle a été isolée à plusieurs reprises chez des sujets ne présentant aucun facteur de risque reconnu, ni aucune pathologie sous-jacente : cinq cas de syndromes coqueluchoïdes chez quatre nourrissons et une fillette de trois ans et un cas de détresse respiratoire aiguë fébrile chez un jeune homme de vingt ans (Le Coustumier *et al.*, 1995).

3. Les formes cliniques

BBS est, dans la très grande majorité des cas, associée à des infections du tractus respiratoire. Elle a été identifiée dans d'autres types d'affections mais cela demeure exceptionnel.

3.1. Les formes respiratoires

Les termes employés dans la littérature pour les désigner sont variés : syndrome pseudo-grippal, syndrome pseudo-coquelucheux, toux atypique, rhinite chronique, trachéobronchite, pneumonie et bronchopneumonie.

Parmi les cinquante deux cas colligés par le réseau d'épidémiologie, on trouve cinq syndromes coqueluchoïdes chez quatre nourrissons et une enfant non vaccinée, une pleurésie purulente et trente quatre bronchopneumonies dont deux avec abcédation.

Le mode de début est en général progressif et l'anamnèse révèle souvent la notion de pneumopathies récidivantes dans les mois qui précèdent la découverte de *BBS*. La fièvre est fréquente mais non constante. La symptomatologie est dominée par une toux sèche en début d'infection puis associée à une expectoration purulente. Cette toux prend parfois la forme de quintes coqueluchoïdes et s'accompagne d'une dyspnée le plus souvent modérée mais qui peut s'aggraver jusqu'à entraîner une détresse respiratoire. D'autres symptômes complètent parfois le tableau clinique : rhinite, conjonctivite, anorexie, diarrhée, amaigrissement.

L'évolution est favorable mais l'amendement des signes cliniques est souvent long et les rechutes fréquentes. Des infections intercurrentes compliquent parfois le tableau clinique.

Aspect particulier des formes respiratoires chez l'enfant : en dépit de son étroite parenté antigénique avec *BP*, *BBS*, parce qu'elle ne synthétise pas de toxine pertussis, ne détermine pas de coqueluche *stricto sensu*. Les syndromes pseudo-coquelucheux recensés dans la littérature décrivent des toux, avec épisodes paroxystiques, évoluant sur plusieurs semaines puis régressant progressivement.

3.2. Les formes extra-pulmonaires

In vitro, *BBS* est capable d'adhérer à différents types de cellules ciliées comme les cellules épendymaires ventriculaires et également à certaines cellules non ciliées comme les fibroblastes (Plotkin and Bemis, 1984).

Plusieurs observations font état de localisations extra-pulmonaires : un cas de méningite (Chang *et al.*, 1975) avec isolement de *BBS* dans un prélèvement de liquide céphalo-rachidien, une sinusite maxillaire (Woolfrey and Moody, 1991), une péritonite chez un patient dialysé (Byrd *et al.*, 1981) et deux septicémies (Dale *et al.*, 1961 ; Katzenstein *et al.*, 1984) dont le point de départ est inconnu mais non respiratoire. Tous ces patients présentaient un terrain fragilisé.

Tableau 6. Cas cliniques d'infections humaines à BBS (3)

Auteur	Sexe	Age	Pathologie sous-jacente	Clinique	Nature du prélèvement où BBS est isolé	Germes associés	Notion d'un contact animal
18) STOLL (1981)	F	26 ans	Maladie de Hodgkin	Pneumopathie fébrile	ECBE	<i>Staphylococcus aureus</i>	Chien mort dans un tableau d'infection respiratoire
19) KATZENSTEIN (1984)	M	70 ans	Hépatopathie cholestatique, hémoglobinopathie probable	Anorexie, amaigrissement, douleurs abdominales intermittentes	Hémocultures	Non	Non
20) BUGGY (1987)	M	65 ans	Leucémie lymphoïde chronique Rechute 6 mois plus tard	Pneumopathie fébrile	ECBE ECBE	Non Non	En contact avec des animaux (porcs et bovins), (chasseur et ancien fermier) Idem
21) PAPASIAN (1987)	M	60 ans	Leucémie lymphoïde chronique	Pneumopathie fébrile chronique	Brossages bronchiques protégés distaux	Streptocoque alpha-hémolytique	Non
22) LEJEUNE (1988)	M	20 ans	Non	Détresse respiratoire aiguë fébrile	Liquide de ponction trans-trachéale	Non	?
23) MEIS (1990)	M	69 ans	Lymphome non hodgkinien Agammaglobulinémie	Pneumopathie	ECBE	Non	Ancien fermier en contact avec de nombreux animaux (chiens-chèvres-chevaux)

Dans la série des 52 patients colligés par le réseau d'épidémiosurveillance (Le Coustumier *et al.*, 1995), 72 isollements de *BBS* ont été réalisés : 28 perfibroscopie, 22 expectorations, trois ponctions pleurales (chez un même patient), trois prélèvements nasaux chez deux patients et une aspiration nasopharyngée chez une enfant et dans 15 cas un mode de prélèvement inconnu. Dans plusieurs cas, des prélèvements distaux perfibroscopiques ont permis d'isoler la bactérie en culture pure et abondante alors que les examens cyto bactériologiques des expectorations restaient négatifs.

VI. DEMONSTRATION DU CARACTERE ZOOTIQUE DE *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

1. Historique

Bien que non démontrée, l'hypothèse du passage de *BBS* de l'animal à l'homme était considérée comme vraisemblable dès la description des premiers cas humains. La notion de contact avec un animal infectant est présente dans plus de la moitié des cas décrits dans la littérature (Tableaux 4 à 7). Dans certains cas, *BBS* est identifiée à partir de prélèvements réalisés simultanément sur les animaux suspectés :

- Deux animaliers en contact avec des lapins et cobayes infectés de façon chronique par *BBS* (Mac Gowan, 1911 ; Ferry, 1917).

- Une enfant de 5 ans atteinte d'un syndrome pseudo-coquelucheux apparu une dizaine de jours après l'acquisition d'un jeune lapin de compagnie atteint de coryza. *BBS* est isolée en grande quantité chez ce lapin à partir d'un écouvillonnage nasal, d'un prélèvement nasopharyngé et de tissus bronchiques prélevés après autopsie (Brown, 1926).

- Les trois plus jeunes enfants d'une famille de fermiers atteints d'une toux coqueluchoïde peu de temps après qu'une infection respiratoire ait emporté quatre des six lapins et trois des cinq chats de la ferme. *BBS* fut isolée dans les prélèvements nasopharyngés des deux chats survivants (Kristensen and Lautrop, 1962).

2. Cas princeps

La démonstration du caractère zootique de l'infection à *BBS* est faite par Gueirard *et al.* en 1995. Ils identifient *BBS* chez une patiente atteinte de pneumonie et isolent également la bactérie chez un lapin de la ferme. Par comparaison des profils en champ pulsé, ils établissent que les souches de la patiente et du lapin sont identiques.

Nous allons développer ce cas en détail parce qu'il regroupe trois caractères importants des infections à *BBS* :

- le caractère zootique,
- la persistance de la bactérie chez l'hôte infecté,
- la variation des facteurs de virulence au cours de l'infection.

2.1. Clinique et épidémiologie

La patiente est une femme âgée de 79 ans hospitalisée en septembre 1989 pour une bronchopneumonie fébrile aiguë. La mise en culture des sécrétions mucopurulentes récoltées lors d'une bronchoscopie permet d'isoler *BBS* en culture pure (souche R1). L'état de la patiente s'améliore après un traitement de deux semaines de minocycline. Une enquête

Tableau 7. Cas cliniques d'infections humaines à BBS (4)

Auteur	Sexe	Age	Pathologie sous-jacente	Clinique	Nature du prélèvement où BBS est isolé	Germe associés	Notion d'un contact animal
24) CHANCEY (1990)	M	56 ans	Transplantation cardiaque	Pneumopathie	ECBE Brossage bronchique protégé distal	<i>Hemophilus Influenzae</i> <i>Staphylococcus Aureus</i> Non	Contact avec des chevaux dont un malade (toux)
25) WOOLFREY (1991)	M	26 ans	Fracture cervicale, quadriplégie	Bronchopneumopathie	Aspiration endotrachéales, cultures de lavage bronchique, aspiration transtrachéale	Staphylocoque coagulase négative	?
26) WOOLFREY (1991)	M	54 ans	Diabète insulino-dépendant. Epiglottite aiguë. Coma	Sinusite	Ponction de sinus maxillaire	<i>Staphylocoque epidermidis</i>	Chien en bonne santé
27) BAUWENS (1992)	F	20 ans	Leucémie myélocytaire, greffe de moëlle osseuse	Pneumonie septicémie	Lavage bronchoalvéolaire ECBE, hémocultures	Non	Contact avec un chien malade

épidémiologique est menée. La patiente vit dans une ferme. Elle possède un jeune chat qui dort fréquemment dans le clapier des lapins. Le chat et les lapins présentent des symptômes compatibles avec une bordetellose (toux associée à une rhinorrhée, conjonctivite). Des écouvillonnages nasaux et oropharyngés pratiqués sur le chat ne permettent cependant pas d'isoler *BBS*.

En décembre 1990, la patiente est hospitalisée à nouveau pour une pneumonie. Deux examens cytobactériologiques des expectorations (ECBE) ne montrent qu'une abondante flore commensale oropharyngée mais *BBS* est isolée (souche R2) en culture pure à partir de prélèvements réalisés par fibroscopie. Un traitement de minocycline est à nouveau instauré pendant un mois. Cinq visites de contrôle, effectuées entre janvier et octobre 1991, confirment l'absence d'infection pulmonaire. Un des lapins qui présente des symptômes de bordetellose est sacrifié et des prélèvements sont effectués à différents étages du tractus respiratoire. Les cultures effectuées à partir de l'appareil respiratoire supérieur sont stériles mais *BBS* (souche L2) est isolée en culture pure à partir du hile et des bronches. Le chat et les lapins sont euthanasiés.

Un an plus tard, en décembre 1991, la patiente souffre d'une toux et *BBS* est isolée à nouveau à partir des expectorations (souche R3). L'état de la patiente s'améliore lentement durant cinq semaines de traitement de minocycline. En février 1992, une radiographie de contrôle ne montre aucun signe d'infection.

En juillet 1992 la patiente présente une bronchite qui est traitée avec de la minocycline. Un ECBE permet d'isoler *BBS* pour la quatrième fois (souche R4). La minocycline est poursuivie pendant un mois. La patiente ne présente plus d'infection durant les 30 mois qui suivent.

2.2. Démonstration de l'identité des isolats par ECP

Comme il n'était pas possible de différencier entre elles les souches R1, R2, R3, R4 et L1 par leurs caractères bactériologiques, ni leur résistance aux antibiotiques, Gueirard *et al.*, ont analysé ces souches par ECP. Cette technique a été utilisée pour comparer les cinq isolats avec une variété de souches de *BBS* d'origine humaine et animale.

Alors que les profils de restriction des isolats d'origines diverses montraient une grande hétérogénéité, les profils des isolats L2, R1, R2 et R3 étaient identiques, indiquant que la même souche était responsable des infections de la patiente et de son lapin. La quatrième et dernière souche isolée chez la patiente, R4, avait un profil très proche des souches L2, R1, R2 et R3.

2.3. Persistance de *Bordetella bronchiseptica* chez l'hôte

Cette femme a présenté quatre infections respiratoires successives à *BBS* sur une période de deux ans. Les deux premières infections ont eu lieu alors que la patiente vivait en contact étroit avec des animaux également infectés par *BBS*. Les deux dernières infections étant apparues alors que la patiente n'était plus en contact avec ces animaux, une persistance de la bactérie dans le tractus respiratoire de la malade est très probable.

L'analyse des sérums de la patiente et de son lapin a montré un taux élevé d'anticorps spécifiques de *BBS*. La persistance de la bactérie malgré ces taux élevés d'anticorps suggère une localisation intracellulaire. Un autre argument en faveur d'une persistance intracellulaire est la mise en évidence par plusieurs études récentes effectuées *in vitro*, de la survie de *BBS* à l'intérieur de cellules épithéliales (Schipper *et al.*, 1994) et de cellules dendritiques (Guzman *et al.*, 1994b).

La bactérie semble capable de faire varier l'expression de ses facteurs de virulence au cours de l'infection. Bien que présentant des profils en ECP identiques, les 5 souches isolées possédaient des phénotypes différents. La souche initialement isolée chez la patiente (R1)

ainsi que celle isolée chez son lapin (L2) exprimaient tous les gènes de virulence et étaient capables d'induire une infection létale chez la souris. Les souches isolées pendant les trois derniers épisodes infectieux de la patiente exprimaient les adhésines mais étaient déficientes en AC-Hly et incapables d'induire une infection létale chez la souris (Gueirard *et al.*, 1995). Gueirard *et al.* proposent un modèle d'infection en trois étapes. Dans l'étape initiale, *BBS* exprimerait tous ses gènes de virulence : les adhésines permettent la colonisation de l'épithélium et l'Ac-Hly permet d'initier l'infection en altérant le fonctionnement des cellules épithéliales et immunitaires. Dans un second temps, la bactérie cesserait de produire l'AC-Hly, incompatible avec sa survie extra ou intracellulaire et continuerait à produire des adhésines. Dans un troisième temps, elle cesserait toute expression des gènes de virulence afin d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et établirait un état de portage (Gueirard *et al.*, 1995).

D'autres observations viennent étayer l'hypothèse d'une persistance intracellulaire. Chez quatorze patients (Le Coustumier *et al.*, 1995), *BBS* a été isolée de multiples fois sur des périodes prolongées malgré des antibiothérapies adaptées. Les anticorps spécifiques détectés dans le sérum de ces patients persistaient généralement à des taux très élevés et ne semblaient pas conférer une immunité protectrice suffisante contre la maladie.

Enfin, ce cas clinique met en évidence les difficultés d'isolement de *BBS*. En décembre 1990, les deux ECBE de la patiente sont négatifs et *BBS* n'est isolée qu'à partir des prélèvements réalisés par fibroscopie. Chez le lapin sacrifié, *BBS* est isolée à partir du hile et des bronches alors que les prélèvements effectués sur l'appareil respiratoire supérieur ne permettent pas l'isolement de la bactérie.

VII. ANTIBIOTHERAPIE

La sensibilité aux antibiotiques est classiquement évaluée par deux méthodes : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et antibiogramme par diffusion en gélose avec mesure des diamètres d'inhibition.

L'analyse des résultats de différentes études met en évidence des discordances selon la méthode utilisée (CMI ou diamètres d'inhibition) et selon les auteurs (pour une méthode donnée).

1. Corrélation CMI / diamètres d'inhibition

Corbières-Priot (1996) a étudié la sensibilité aux antibiotiques de 80 souches (40 souches d'origine humaine, 40 souches d'origine animale) de *BBS* par la détermination des CMI et par la mesure des diamètres d'inhibition et a évalué la corrélation entre ces deux méthodes. D'après l'antibiogramme par diffusion en gélose, *BBS* est rendue à tort sensible à certains antibiotiques. Des discordances très importantes (plus de 50% des souches changent de catégorie) se notent pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la ciprofloxacine, l'ofloxacine et la péflacine.

D'après Corbière-Priot, l'antibiogramme par diffusion en gélose est peu fiable et doit être interprété avec prudence. Il permettrait de mettre en évidence l'inactivité complète de certains antibiotiques (cefalexine, streptomycine, lincosamine, clindamycine, oxacilline...) ainsi que

les résistances acquises aux sulfamides, aux tétracyclines et à la doxycycline. Il ne permettrait aucune conclusion pour une souche rendue sensible à des antibiotiques comme l'ampicilline, l'amoxicilline, l'association amoxicilline-acide clavulanique, l'érythromycine et les autres macrolides, les quinolones. La sensibilité *in vitro* d'une souche à un antibiotique ne pourrait s'affirmer qu'après étude des CMI.

2. Etude de la sensibilité par classe d'antibiotique

2.1. Bêtalactamines

2.1.1. Pénicillines

En termes de CMI (Corbières-Priot, 1996 (80 souches)), *BBS* est :

- résistante aux aminopénicillines : ampicilline, amoxicilline.
- modérément sensible vis à vis de l'association amoxicilline-acide clavulanique, l'association ampicilline-sulbactam et la ticarcilline.
- habituellement sensible à l'association ticarcilline-acide clavulanique, aux uréidopénicillines (mezlocilline, pipéracilline, association pipéracilline-tazobactam, azlocilline).

2.1.2. Céphalosporines et monobactames

BBS est résistante à la plupart des céphalosporines (Corbière-Priot, 1996) :

- de première génération : céfalexine, céfazoline, céfalotine
- de deuxième génération : céfuroxime, céfoxitine, céfamandol
- de troisième génération : céfixime, cefpodoxime, céfotaxime

Les monobactames (aztréonam) et les nouvelles céphalosporines (céfépime et cefpirome) ont une mauvaise activité (Corbière-Priot, 1996).

BBS est modérément sensible à quelques céphalosporines de troisième génération : céfopérazone, latamoxef (Philippon, *et al.*, 1991 (23 souches) ; Farzaneh, 1993 (21 souches) ; Corbière-Priot, 1996).

Farzaneh (1993) observe l'existence d'un phénotype de résistance aux bêta-lactamines dont les céphalosporines. La synergie entre l'amoxicilline et un inhibiteur enzymatique de bêta-lactamase (acide clavulanique) suggère l'existence d'une bêta-lactamase.

2.1.3. Carbapénèmes

BBS est habituellement sensible à l'imipénème et au méropénème (Corbière-Priot, 1996).

2.2. Aminosides et apparentés

En terme de CMI (Philippon *et al.*, 1991 ; Corbière-Priot, 1996), *BBS* est :

- sensible à la gentamycine, à la nétilmicine, à la tobramycine,
- modérément sensible vis à vis de l'amikacine,
- résistante à la streptomycine, à la spectinomycine et à l'apramycine.

Terakato (1981) a mis en évidence l'existence d'une résistance croisée à la streptomycine, à la tétracycline, à la sulfadiméthoxine, au chloramphénicol et à la kanamycine.

2.3. Cyclines

BBS est habituellement sensible aux cyclines : tétracycline, doxycycline et minocycline (Mortensen, 1989 (48 souches) ; Pijpers, 1989 (20 souches)).

Dans l'étude de Corbière-Priot, une souche sur 80 est résistante, en terme de CMI, à la tétracycline, intermédiaire à la doxycycline et sensible à la minocycline. Cette même souche est, en terme de diamètre, résistante à la doxycycline et à la minocycline. L'antibiogramme par diffusion sur gélose paraît adapté à la détection de la résistance aux cyclines.

Un plasmide de résistance aux tétracyclines, à l'ampicilline, aux sulfamides et à la streptomycine a été mis en évidence chez une souche de *BBS* d'origine féline (Speakman *et al.*, 1997). La résistance à l'ampicilline était médiée par une bêta-lactamase inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam. La résistance à la tétracycline était codée par le gène *tetC*. Speakman a réalisé le transfert de ce plasmide à une souche d'*Escherichia coli* K12.

2.4. Macrolides et apparentés

Les macrolides et apparentés montrent une mauvaise activité.

Les publications dans leur ensemble considèrent l'érythromycine comme inactive, en terme de CMI, sur *BBS* (Buggy, 1987 (1 souche) ; Ishikawa, 1988 (1 souche) ; Kurzynski, 1988 (11 souches) ; Mortensen, 1989 (48 souches) ; Meis, 1990 (2 souches)).

D'après Corbière-Priot (1996), *BBS* est résistante, en terme de CMI, aux macrolides en C14 (érythromycine, roxithromycine, clarithromycine), en C15 (azithromycine), en C16 (josamycine), à la tylosine et à la pristinamycine. Les macrolides en C14 et en C15 montrent une meilleure activité que les macrolides en C16 mais tous sont inactifs en termes de CMI. Les diamètres d'inhibition décèlent bien la mauvaise activité des macrolides : *BBS* est résistante à l'érythromycine, la spiramycine, aux lincosamines (lincomycine et clindamycine), aux streptogramines (pristinamycine et virginamycine), à la tylosine et à l'oléandomycine. L'érythromycine, classiquement prescrite dans le traitement de la coqueluche (*BP*) ne serait donc pas indiquée dans le traitement contre *BBS*.

2.5. Sulfamides et triméthoprime

En terme de CMI, *BBS* est, selon les auteurs :

- inconstamment sensible à l'association sulfamide-triméthoprime (Mortensen, 1989 (48 souches) ; Corbière-Priot, 1996 (80 souches)),
- résistante (Kurzynski, 1988 (11 souches)).

Terakato (1974) évoque un mécanisme de résistance plasmidique aux sulfamides.

2.6. Quinolones

En terme de CMI, *BBS* est, selon les auteurs :

- sensible à la sparfloxacine (Corbière-Priot, 1996 (80 souches)), à l'ofloxacine et à la ciprofloxacine (Pijpers, 1989 (20 souches) ; Fass, 1996 (10 souches)),
- modérément sensible à l'ofloxacine, la ciprofloxacine, la péfloxacine et l'acide nalidixique (Corbière-Priot, 1986 (80 souches)),
- résistante à l'ofloxacine, la ciprofloxacine et la norfloxacine (Kurzynski, 1988 (11 souches)), à la fluméquine (Pijpers, 1989 (20 souches)).

En terme de diamètre (Corbière-Priot, 1996), *BBS* est :

- sensible à l'ofloxacine, la ciprofloxacine et l'acide nalidixique,
- résistante à la péfloxacine, la fluméquine et la norfloxacine.

2.7. Phénicolés

En terme de CMI, *BBS* est, selon les auteurs :

- sensible (Mortensen, 1989 (48 souches)),
- modérément sensible (Pijpers, 1989 (20 souches) ; Corbières-Priot, 1996 (80 souches)),

- résistante (Kartzenstein, 1984 (1 souche)).

En terme de diamètre, *BBS* est sensible au chloramphénicol (Corbière-Priot, 1986).

En conclusion, ces différentes études rapportent une très bonne activité des tétracyclines et des aminosides, une activité bonne ou modérée selon les quinolones, l'existence de résistances aux sulfamides et aux bêtalactamines et une très mauvaise activité des céphalosporines et des macrolides.

Une étude concernant des antibiotiques couramment utilisés en médecine vétérinaire donne des résultats similaires. Speakman *et al.* (1997), ont déterminé les pourcentages de résistance aux antibiotiques de 152 isolats, en majorité d'origine féline (147/152) : 90 % des souches de *BBS* sont résistantes à l'ampicilline, 85 % au triméthoprim, 30 % à la sulfadiazine, 15 % à l'association amoxicilline-acide clavulanique, 7 % à l'enrofloxacin, 2 % à la doxycycline et 1 % à la tétracycline.

3. Facteurs de variation de la sensibilité

Il semble que l'état de virulence de la bactérie (dépendant des conditions de culture) ait une influence sur la sensibilité aux antibiotiques.

Ishikawa (1988) a décrit des variations de sensibilité importantes aux pénicillines, aux céphalosporines et aux aminosides, pour une même souche, en fonction de la température.

D'autre part, les CMI de l'érythromycine et de l'ampicilline sont plus basses avec le milieu de Bordet-Gengou qu'avec le milieu de Mueller-Hinton (Corbière-Priot, 1996).

Conclusion

Les résultats obtenus *in vitro* permettent de choisir un antibiotique adapté à la souche isolée mais d'autres facteurs interviennent dans le résultat thérapeutique final.

Les rechutes sont fréquentes malgré des traitements longs et adaptés. Elles peuvent en partie s'expliquer par une mauvaise diffusion des antibiotiques dans le mucus bronchique. *BBS* est localisée sur l'épithélium cilié et les concentrations active des antibiotiques dans les sécrétions respiratoires qui atteignent l'épithélium peuvent être très différentes des concentrations sériques (Wong *et al.*, 1975). L'hypothèse d'une persistance intracellulaire pourrait également expliquer la relative inefficacité des traitements antibiotiques.

VIII. VACCINS

1. Immunologie de l'appareil respiratoire

Les facteurs de protection non spécifiques assurent l'élimination de la majorité des bactéries. Ils se composent de facteurs mécaniques (filtration des particules, transport mucociliaire, toux), de facteurs solubles ayant une activité bactéricide et de facteurs immunologiques non spécifiques (phagocytose, voie alterne du complément).

Les facteurs de protection spécifiques apparaissent de façon secondaire au cours de l'infection, ils se mettent en place lorsque les facteurs bactériens de virulence ont permis à

l'agent pathogène d'échapper aux facteurs de défense non spécifiques de l'hôte. Ils nécessitent une reconnaissance spécifique de la bactérie par le système immunitaire de l'hôte.

Les réponses immunitaires sont fondamentalement différentes selon qu'elles s'adressent à des pathogènes extracellulaires ou intracellulaires. Les bactéries à multiplication extracellulaire entraînent des phénomènes de défense liés à la production d'anticorps spécifiques. Les bactéries à multiplication intracellulaire entraînent des phénomènes de défense à médiation cellulaire : lymphocytes T auxiliaires et lymphocytes T cytotoxiques. Les deux mécanismes de défense agissent en synergie. Les anticorps et le complément bloquent la phase précoce de l'infection mais la guérison n'est obtenue que par la destruction des cellules infectées. Ces considérations doivent être prises en compte dans le développement des vaccins.

Plusieurs mécanismes faisant intervenir des facteurs mécaniques, des facteurs solubles et des facteurs immunologiques contribuent donc à assurer la stérilité du compartiment alvéolaire.

1.1. Les facteurs mécaniques

La filtration des particules en fonction de leur taille, le transport mucociliaire et la toux constituent les moyens de défense mécaniques.

L'appareil mucociliaire recouvre les voies respiratoires depuis les bronchioles jusqu'aux voies aériennes supérieures. Le mucus est constitué d'une couche superficielle, visqueuse et d'une couche profonde, fluide, en contact avec les cils présents sur les cellules épithéliales. Les particules inhalées sont emprisonnées dans la couche superficielle et les mouvements synchrones des cils assurent leur évacuation vers le carrefour oropharyngé où elles sont expectorées. Ce mécanisme est sensible aux variations du milieu (humidité, température), ce qui explique l'importance des conditions hygiéniques dans la prévention des affections respiratoires.

1.2. Les facteurs solubles

Les sécrétions mucosales contiennent des enzymes possédant une activité antibactérienne. La lactoferrine inhibe la croissance bactérienne en diminuant la concentration en fer, le lysozyme dégrade le peptidoglycane de la paroi bactérienne et l'alpha 1 anti-trypsin protège la surface pulmonaire contre les protéases bactériennes. Le surfactant semble également posséder une activité bactéricide.

1.3. Les facteurs immunologiques

Les facteurs immunologiques se répartissent en facteurs non spécifiques et en facteurs spécifiques.

1.3.1. Réponses immunitaires naturelles

Elles sont réalisées par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules utilisent des systèmes de reconnaissance primitifs, non spécifiques et phagocytent les agents pathogènes. Elles interviennent également dans les mécanismes de l'immunité spécifique.

1.3.2. Réponses immunitaires spécifiques

Elles sont réalisées par les lymphocytes B et T. Ces cellules reconnaissent de façon spécifique les agents pathogènes et engendrent des réponses immunitaires adaptatives.

Les lymphocytes B produisent des anticorps et jouent un rôle prépondérant dans les infections par les bactéries extracellulaires.

Les lymphocytes T n'interagissent pas directement avec les bactéries mais avec les cellules de l'hôte infecté. Ils sont les médiateurs centraux de la protection contre les infections par les bactéries intracellulaires.

1.3.2.1. Immunité contre les bactéries extracellulaires

Les immunoglobulines sécrétées par les lymphocytes B sont les facteurs essentiels de la défense spécifique vis-à-vis des bactéries à multiplication extracellulaires. Elles diffusent dans la lumière broncho-alvéolaire à partir de la circulation générale (immunité systémique) ou sont synthétisées localement par les plasmocytes sous-muqueux (immunité locale).

Les IgA sécrétoires, résultant d'une synthèse locale, se présentent sous la forme de dimères d'IgA circulantes associées par une pièce sécrétoire. L'activité principale des IgA est l'inhibition de l'adhésion des bactéries aux épithélium de surface.

Les IgG sont surtout présentes dans la partie basse du tractus respiratoire (bronchioles et alvéoles) à l'inverse des IgA présentes dans la partie haute du tractus. Elles jouent un rôle majeur dans la défense antibactérienne pulmonaire : agglutination des bactéries, opsonisation et phagocytose, neutralisation de toxines, fixation du complément et lyse des bactéries.

Les IgE sont détectables en grande quantité uniquement dans les lavages alvéolaires de sujets allergiques. Elles provoquent la libération d'amines vasoactives.

Les IgM jouent probablement un rôle minime dans les défenses pulmonaires en raison de leur très faible concentration.

1.3.2.2. Immunité contre les bactéries intracellulaires

Les cellules T sont les médiateurs centraux de la protection contre les infections par les bactéries intracellulaires. Ces cellules n'interagissent pas directement avec les bactéries, mais avec les cellules de l'hôte infecté. Les lymphocytes T auxiliaires (TH) sécrètent des cytokines qui contrôlent les réponses immunitaires et les lymphocytes T cytotoxiques (TC) détruisent les cellules infectées.

La majorité des lymphocytes T sont regroupés en deux grandes catégories : les cellules CD4+ et les cellules CD8+. Les lymphocytes CD4+ reconnaissent les antigènes dégradés en fragments peptidiques et présentés par des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Les lymphocytes CD8+ reconnaissent des fragments d'antigènes endogènes présentés sur des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité.

Les lymphocytes CD4+ peuvent être séparés en deux sous populations Th1 et Th2 selon le profil des cytokines qu'ils produisent. Les cellules Th1 sécrètent, en réponse à l'antigène dont elles sont spécifiques, de l'interleukine 2, de l'interféron gamma et du TNF. Elles orientent la réponse immunitaire vers une réaction à médiation cellulaire dominante et participent aux réactions de cytotoxicité et d'inflammation locale. Les cellules Th2 sécrètent les interleukines 4, 5, 6 et 10. Elles orientent la réponse immunitaire vers une réaction à médiation humorale en stimulant la prolifération des lymphocytes B et la synthèse d'anticorps.

Au cours des infections par les bactéries intracellulaires, les activités cellulaires de type Th1 sont prépondérantes.

Les bactéries ingérées sont rapidement détruites par la fusion des lysosomes avec les vacuoles de phagocytose. Cependant, l'ensemble ou une partie des bactéries peuvent échapper aux mécanismes de destruction intra-phagocytaire par différents mécanismes (synthèse d'enzymes et de protéines protectrices, évasion du phagosome vers le compartiment cytoplasmique). Ces mécanismes permettent la survie intracellulaire de la bactérie.

2. Les vaccins actuels

Rappelons que l'activité d'un vaccin représente la capacité qu'il a de protéger des animaux vivants en milieu non contaminé (laboratoire) contre des épreuves virulentes (administration par aérosol ou par voie intra-nasale de souches pathogènes dans le cas de *BBS*).

L'efficacité se mesure sur le terrain face à une infection naturelle.

L'innocuité est l'absence de réaction locale ou générale chez l'animal vacciné. Elle comprend également le risque de contamination et d'infection par l'agent vaccinal des sujets (animaux ou humains) en contact avec l'animal vacciné.

Aujourd'hui, essentiellement deux types de vaccins anti-*BBS* sont disponibles : des vaccins entiers inactivés et des vaccins vivants atténués.

2.1. Vaccin entier inactivé chez le chien

Chez le chien, les premiers essais d'immunisation contre *BBS* avec un vaccin entier inactivé sont effectués par Mac Candlish et Thompson.

Dans un premier essai, Mac Candlish et Thompson (1978a) vaccinent des chiots en leur injectant par voie parentérale une préparation de *BBS* inactivées par la chaleur puis les soumettent à un aérosol de *BBS* virulentes. Malgré des taux d'anticorps circulants élevés, tous les chiots développent une infection respiratoire.

Dans un second essai, Mac Candlish et Thompson (1978b) vaccinent six chiots avec un vaccin tué adjuvé à l'hydroxide d'aluminium puis les soumettent ainsi que les six chiots témoins à un aérosol de *BBS* virulentes. Les six chiens non vaccinés présentent des symptômes d'infection respiratoire contre seulement deux chiens vaccinés. De plus, la toux est moins sévère et rétrocede plus rapidement chez les chiens vaccinés que chez les non vaccinés. Des prélèvements nasaux et pharyngés sont effectués quotidiennement à partir du jour de l'épreuve virulente jusqu'à la fin de l'expérimentation vingt jours plus tard. Dans le groupe de chien non vaccinés, *BBS* est isolée sur presque tous les échantillons et souvent en culture riche durant toute la durée de l'expérience. Dans le groupe de chiens vaccinés, *BBS* est également isolée durant les vingt jours mais moins fréquemment et les cultures sont moins riches.

Les taux d'anticorps circulants étant similaires dans les deux essais, les auteurs attribuent l'efficacité du vaccin adjuvé à une meilleure stimulation de l'immunité humorale locale et / ou de l'immunité à médiation cellulaire.

Ce vaccin accorde une protection : les symptômes de l'infection sont absents ou diminués et la clairance bactérienne est plus rapide. Mais cette protection n'est que partielle : le vaccin n'empêche pas la colonisation des voies respiratoires par la bactérie. Dans certains cas, il ne prévient pas le développement de l'infection.

Des vaccins entiers inactivés adjuvés sont utilisés actuellement chez le chien, seuls ou associés à une valence parainfluenza virus. PneumodogND (Merial) est actuellement le seul vaccin de ce type commercialisé en France. Ces vaccins semblent bien tolérés (Guitton, 1987). Dans un effectif, ils réduisent de manière significative l'incidence de la maladie et les chiens atteints présentent des symptômes moins sévères. Ils ne préviennent cependant pas le portage.

2.2. Vaccins vivants atténués chez le chien

2.2.1. Généralités

Chez le chien, Shade et Goodnow (1979) réalisent les premiers essais d'immunisation contre *BBS* avec un vaccin vivant atténué administré par voie intra-nasale. Ils utilisent la souche atténuée S-55, isolée à partir des poumons d'un porc atteint de pneumonie et conservée durant 17 ans dans un bouillon à 37°C. La vaccination réduit significativement, par rapport au lot témoin, l'incidence des signes cliniques chez les chiens vaccinés et soumis à une épreuve

virulente. La clairance bactérienne est également meilleure chez les chiens vaccinés mais ces derniers restent porteurs de la souche d'épreuve pendant au moins quatre semaines.

Administrée par voie intra-nasale, la souche vaccinale se multiplie au niveau de la muqueuse respiratoire et provoque une stimulation de l'immunité locale. Dans une expérience similaire, Bey (1981) observe une corrélation entre le taux d'IgA mesuré dans les sécrétions nasales des chiens vaccinés et la protection accordée par le vaccin.

Des vaccins vivants atténués contenant la souche S-55 sont utilisés actuellement chez le chien. Intra-trac 1ND (Scherring-Plough) est actuellement le seul vaccin de ce type commercialisé en France. Dans un effectif, ils réduisent significativement l'incidence de la maladie et la sévérité des symptômes. Ils ne préviennent pas le portage.

2.2.2. Innocuité de la souche vaccinale S-55

Le vaccin vivant atténué souche S-55 semble bien toléré. Le dossier technique du vaccin Intra-trac 1 mentionne que dans une série d'essais réalisés dans des conditions expérimentales ou sur le terrain, la vaccination de 1020 chiens a entraîné 5,4% de réactions (toux, étternuements, jetage clair).

La souche S-55 se multiplie dans le tractus respiratoire des chiens vaccinés. Dans leur essai, Shade et Goodnow l'isolent systématiquement dans les cavités nasales 7 et 14 jours après la vaccination. Les chiens restent donc porteurs de la souche vaccinale pendant au moins deux semaines.

La souche S-55 est excrétée par le chien vacciné et contamine les chiens vivants à son contact. Kontor (1980) a étudié la possibilité d'un retour à la virulence de la souche S-55 par passages successifs de chien à chien. Il isole une première fois la souche vaccinale chez deux chiens vaccinés six jours auparavant. Il isole également la souche vaccinale chez un chien non vacciné mais en contact avec les chiens vaccinés. Il vaccine ensuite deux autres chiens avec la souche isolée précédemment. Il isole à nouveau, six jours plus tard, la souche vaccinale chez ces chiens mais ne parvient pas à l'isoler pas chez un chien contact. Avec cette souche, il vaccine deux derniers chiens. Il ne parvient plus à isoler la souche vaccinale chez ces deux chiens, ni chez un chien contact. Aucun des neuf chiens de l'essai n'a présenté de symptômes de toux de chenil. Dans cet essai, la souche vaccinale semble perdre son pouvoir infectant après un passage de chien à chien.

La transmission de la souche vaccinale S-55 à l'homme n'a jusqu'à présent pas été mise en évidence, ni directement (isolement de la souche S-55 chez une personne en contact avec un chien vacciné), ni indirectement (conversion sérologique chez cette personne).

L'innocuité pour l'homme de cette souche vaccinale reste cependant à évaluer.

2.3. Vaccins dans d'autres espèces

2.3.1. Vaccins félins

Peu de publications font état de l'utilisation de vaccins félins contre la bordetellose.

Jacobs *et al.* (1993) décrivent l'utilisation d'un vaccin acellulaire expérimental formé de sous-unités fimbriales. Ils vaccinent dix chatons avec un vaccin composé d'une suspension de fimbriae adjuvée. Les chatons sont vaccinés par voie SC à l'âge de quatre et six semaines et soumis à un aérosol de BBS virulentes à huit semaines. La protection accordée contre une épreuve virulente est jugée bonne et la clairance de la souche d'épreuve est meilleure chez les chatons vaccinés.

Ce vaccin supprime presque complètement les signes cliniques mais n'empêche pas l'infection des voies respiratoires. Son efficacité sur le terrain, la protection conférée contre une infection naturelle, n'est pas mentionnée.

2.3.2. Vaccins porcins

Des vaccins entiers inactivés ou atténués ont été utilisés, dès 1970, chez le porc dans la prévention de la rhinite atrophique. Ces vaccins se sont avérés peu efficaces et ne permettent pas l'élimination rapide de la bactérie des cavités nasales des animaux infectés (Giles and Smith, 1983). En fonction de l'évolution des connaissances sur l'étiologie de la rhinite atrophique, des vaccins associant *BBS* et *PM* sont actuellement utilisés dans certaines porcheries industrielles. La vaccination des truies confère une relative immunité d'origine colostrale aux jeunes porcelets (Smith *et al.*, 1982). Cette protection persiste souvent jusqu'au sevrage. La vaccination n'est qu'un des éléments de lutte contre la bordetellose, elle ne permet pas à elle seule l'éradication de la maladie. Si elle permet de limiter l'incidence de la rhinite et des pneumonies chez les porcelets, elle a des effets limités sur le développement de la maladie chez les porcs à l'engraissement et sur la prévalence et la sévérité des lésions de rhinite atrophique constatées à l'abattoir.

Conclusion sur les vaccins actuels

Ces vaccins sont bien tolérés et confèrent une protection non négligeable. Ils diminuent sensiblement l'intensité et la durée de la symptomatologie. Ils augmentent la clairance bactérienne.

Ces vaccins réduisent ou suppriment l'expression clinique de la maladie mais ils n'empêchent pas le portage.

Aucun vaccin ne prévient complètement l'attachement et les effets toxiques de *BBS*.

3. Vaccins de seconde génération

3.1. Généralités

BBS a développé des stratégies adaptatives particulièrement sophistiquées. Elle semble capable de faire varier l'expression de ses facteurs de virulence afin d'échapper aux défenses immunitaires et persister chez l'hôte, probablement de manière intracellulaire, sur une très longue période de temps (Gueirard, 1995).

Dans le modèle murin, l'immunité à médiation humorale et l'immunité à médiation cellulaire sont toutes deux importantes dans la réponse immune à l'infection par *BBS*. Les anticorps assurent une destruction rapide des bactéries extracellulaires. La réponse cellulaire facilite l'élimination du réservoir intracellulaire de bactéries et évite l'installation d'un état de portage (Gueirard, 1995).

Pour être efficace, un vaccin doit générer ces deux types de réponse et doit induire une immunité de longue durée (Gueirard, 1995).

Sa constitution doit également tenir compte de la grande hétérogénéité observée au sein de l'espèce *BBS*. L'analyse des profils obtenus par ECP (Weber and Guiso, données non publiées) de 60 souches de *BBS* révèle une hétérogénéité plus importante que chez *BP*. Un polymorphisme important de certaines régions de la PRN a été mis en évidence par séquençage (Boursaux-Eude and Guiso, 2000).

3.2. Elaboration d'un vaccin acellulaire

Les travaux réalisés chez la souris ont permis de caractériser différents facteurs impliqués dans la virulence de *BBS*. La connaissance du rôle pathogène de ces facteurs dans l'infection ainsi que leur pouvoir immunogène devrait permettre la mise au point de vaccins acellulaires. Des expériences de protection active ont montré que les Fim (Savelkoul, 1992) et la PRN (Kobish and Novotny, 1990) sont des antigènes protecteurs contre l'infection par *BBS* dans le modèle murin. La FHA et le LPS pourraient également avoir un effet protecteur.

Le rôle essentiel joué par l'AC-Hly dans l'initiation de l'infection par *BBS* chez la souris ainsi que son pouvoir protecteur équivalent à celui du vaccin entier a été mis en évidence (Guiso *et al.*, 1989). Gueirard (1995) a comparé dans le modèle murin la nature des réponses cellulaires et humorales induites après immunisation par la protéine AC-Hly purifiée de *BBS* à celles obtenues après l'infection. L'infection respiratoire par *BBS* induit une immunité cellulaire spécifique persistante impliquant des lymphocytes CD4+ Th1 (ce résultat est en corrélation avec l'augmentation du nombre de cas d'infections humaines à *BBS* chez des sujets présentant une immunodéficiences T, notamment les sujets VIH+). Chez la souris vaccinée par le vaccin entier ou le vaccin acellulaire AC-Hly, la réponse obtenue est de même nature qu'après l'infection, à savoir une faible réponse anticorps spécifique et des réponses cellulaires de type Th1 (la réponse IgA reste à étudier). D'après Gueirard, les réponses immunes médiées par les cellules Th1 jouent un rôle fondamental dans l'acquisition d'une immunité protectrice contre l'infection par *BBS* et il semble que ce type de réponses soit obtenu avec le vaccin acellulaire composé d'AC-Hly. La durée de l'immunité conférée par ce vaccin et l'absence de persistance de la bactérie restent à évaluer.

La poursuite de ces différents travaux devrait permettre la mise au point d'un vaccin efficace contre l'infection par *BBS* chez l'animal.

IX. FACTEURS D'EMERGENCE

Depuis une vingtaine d'années, la fréquence des isollements de *BBS* semble augmenter. De plus, compte tenu du manque de sensibilité du diagnostic par mise en culture, du peu de spécificité des signes cliniques et de l'existence de porteurs asymptomatiques, il est vraisemblable que la maladie soit sous diagnostiquée et que *BBS* circule à une fréquence très supérieure aux quelques cas diagnostiqués chaque année.

Le Centre National de Référence a mené une enquête sérologique chez des éleveurs de porcs. L'infection par *BBS* entraîne la synthèse d'anticorps anti-AC-Hly, anti-FHA et anti-LPS. L'infection par *BP* entraîne de plus une synthèse d'anticorps dirigés contre la toxine pertussis. On ne dispose pas pour l'instant d'anticorps spécifiques de *BBS* mais les facteurs de virulence de *BP* présentant une très forte homologie avec ceux de *BBS*, il est possible de les utiliser pour réaliser l'analyse sérologique des patients infectés par *BBS*. L'enquête sérologique a montré la présence quasi constante de taux élevés d'anticorps spécifiques de *BBS* chez ces éleveurs. Ces taux élevés d'anticorps sont compatibles avec un portage asymptomatique de *BBS* (Le Coustumier *et al.*, 1995).

Différents facteurs pourraient contribuer à l'émergence de cette zoonose.

1. Facteurs liés à l'homme

1.1. Fragilisation du terrain

BBS se présente chez l'homme comme un pathogène opportuniste et atteint principalement des individus dont l'immunité est défaillante.

Le progrès médical rend possible des survies prolongées chez des patients atteints de maladies graves et favorise de ce fait l'apparition de maladies nouvelles par fragilisation du terrain. Le vieillissement des populations entraîne une augmentation du nombre de sujets âgés présentant une affection respiratoire chronique ou affaiblis par une maladie intercurrente. Les situations favorisant le développement d'une infection ou d'une surinfection à *BBS* se rencontrent probablement de manière plus fréquente que par le passé :

- immunosuppressions : chimiothérapies anticancéreuses, transplantations d'organes, atteintes par le virus HIV, hémopathies...
- affections respiratoires chroniques : bronchites chroniques liée au tabagisme, néoplasies, asthmes graves, séquelles de tuberculose...

1.2. Antibiothérapie inadaptée

BBS est résistante à de nombreux antibiotiques actuellement utilisés. Les antibiotiques prescrits dans les infections respiratoires et la durée des traitements peuvent, s'ils ne sont pas adaptés à *BBS*, modifier la pression de sélection en faveur de ce pathogène.

BBS pourrait se présenter comme une nouvelle bactérie pathogène opportuniste à cause de sa résistance naturelle à certains nouveaux antibiotiques très fréquemment prescrits comme les céphalosporines de troisième génération (Philippon *et al.*, 1991). La majorité de ces céphalosporines, dont les formes orales (céfixime, cefpodoxime), récemment introduites en pratique pneumologique, sont totalement inactives contre *BBS* (Corbières-Priot, 1996). La prescription de ces antibiotiques pourrait favoriser le développement d'infections à *BBS* par modification de la pression de sélection.

Les macrolides, antibiotiques de référence dans le traitement de la coqueluche (*BP*), sont peu actifs contre *BBS*. D'autres antibiotiques, classiquement prescrits dans les infections broncho-pulmonaires et ORL sont, du fait de l'existence de résistances acquises, modérément actifs comme les quinolones ou inconstamment actifs comme les pénicillines (Corbières-Priot, 1996). La durée des traitements antibiotiques pourrait également intervenir. *BBS* est un germe qui persiste plus longtemps dans le tractus respiratoire que la plupart des autres pathogènes et nécessite un traitement de longue durée (trois à cinq semaines). Un traitement d'une durée standard, adapté à une bactérie classique, pourrait favoriser l'apparition d'infections à *BBS*.

1.3. Protection croisée avec *Bordetella pertussis*

Des évaluations épidémiologiques ont récemment mis en évidence une résurgence de la coqueluche en France (Baron, 1995). Le vaccin coqueluche avait permis de réduire très fortement l'incidence de cette maladie. Le protocole comporte une primovaccination à l'âge de 3-4 mois et un rappel à l'âge de 16-18 mois. Ce vaccin entier est mal toléré chez l'enfant plus âgé ainsi que chez l'adulte et ces effets secondaires empêchent des rappels ultérieurs. Depuis quelques années, faute de rappels naturels (la circulation de *BP* est réduite) et vaccinaux (seuls les jeunes enfants sont vaccinés), l'immunité des jeunes adultes a baissé. Ces derniers font des coqueluches souvent atypiques et difficiles à diagnostiquer. Ils constituent le réservoir principal de *BP* et contaminent les nourrissons incomplètement ou non vaccinés et chez lesquels la coqueluche est potentiellement mortelle.

L'identification des facteurs de virulence de *BP* a permis de mettre au point des vaccins composés de facteurs purifiés. Ces vaccins dits acellulaires entraînent peu d'effets secondaires et permettront une vaccination de rappel chez les adolescents.

Dans le modèle murin, le vaccin coqueluche entier semble conférer une protection contre *BP* mais aussi contre *BBS* ou *BPP*. A l'inverse, le vaccin acellulaire composé des facteurs purifiés

de *BP* ne semble pas protéger contre *BBS*, ni contre *BPP*. Malgré une très forte homologie entre les espèces de *Bordetella* et les facteurs qu'elles synthétisent (plus de 95% d'identité pour certains) il n'y a pas de protection croisée par ces facteurs (Khelef *et al.*, 1993).

Les anticorps spécifiques de l'AC-Hly présents dans le sérum de patients ou de souris infectées par *BP* sont essentiellement dirigés contre des épitopes présents uniquement dans la portion hémolysine C-terminale de la molécule. Cette région est indispensable à l'activité immunoprotectrice de la molécule AC-Hly (Betsou *et al.*, 1995b). L'absence de protection croisée entre l'AC-Hly de *BP* et de *BBS* peut s'expliquer par le fait que les différences observées entre les deux molécules sont portées par cette région C-terminale (Betsou *et al.*, 1995a).

Les vaccins coqueluche entiers utilisés jusqu'à présent conféraient probablement une certaine protection contre les infections à *BBS*. Les vaccins coqueluche acellulaires n'assurant pas de protection croisée contre les autres *Bordetella*, leur utilisation risque, dans les années à venir, d'entraîner une augmentation des infections à *BBS*.

2. Facteurs liés à la relation homme / animal

Dans la société occidentale, l'animal de compagnie occupe une place grandissante dans la cellule familiale. Les liens qui l'unissent à son maître sont plus étroits que par le passé. Ces données interviennent probablement dans l'épidémiologie des zoonoses en général et des infections à *BBS* en particulier.

Le nombre des nouveaux animaux de compagnie (NAC) est en constante augmentation ces dernières années. Les rongeurs et lagomorphes sont particulièrement appréciés par les enfants. Leur importance dans l'épidémiologie des infections à *BBS* reste à évaluer mais certaines espèces (lapin, cobaye) sont particulièrement sensibles à *BBS*.

L'importance de la contamination directe ou indirecte (par l'intermédiaire d'un animal de compagnie comme le chat) de l'homme par la faune sauvage n'est pas connue.

L'existence d'un réservoir naturel (eau de lac) n'a pas été évaluée.

3. Facteurs liés à la modification des techniques d'élevage

L'élevage industriel hors sol crée des conditions de confinement favorables au développement des bordetelloses animales.

La prévalence de la rhinite atrophique dans les élevages de porcs est élevée et les sérologies pratiquées chez des éleveurs (cf supra) témoignent d'un contact avec la bactérie. La prévalence des infections cliniques à *BBS* chez les éleveurs n'a pas été évaluée mais il est probable qu'ils constituent une population particulièrement exposée.

CONCLUSION

BBS est l'agent d'une zoonose qui pourrait prendre de l'ampleur dans les années à venir. Les données concernant sa prévalence dans les différentes espèces animales sont encore fragmentaires. La recherche de cette bactérie chez le chien, animal de compagnie le plus répandu, est une étape importante dans l'évaluation du risque de transmission de cette maladie à l'homme.

	chien	CHP	CHPPi	Clinique	Traitement antibiotique en cours	BBS
GROUPE I 28/01/200	1		11/1 28/1	TC	enrofloxacin + aérosol gentamicine	
	2		21/11 7/12 7/1 28/1	TC	enrofloxacin + aérosol gentamicine	
	3		11/1 28/1	TC	clindamycine	
	4		7/1 21/1	TC	clindamycine	BBS II
	5		7/1 21/1	TC	clindamycine	BBS II / I
	7		10/11 6/12 17/12 7/1	sain guéri de TC		BBS II
	8		1/12 17/12 27/12	sain contact avec 7	doxycycline + aérosol gentamicine	BBS II
	9		30/11 21/1			
	10		3/11 14/11 30/12			
	11		1/12 27/12 13/1			
	12		27/12 18/1			
	13		1/12 31/12 21/1	TC		
	15		23/12 7/1	sain guéri de TC		BBS II
	16		27/12 18/1			
17		29/11 9/12 30/12			BBS II	
18		10/12 17/12 7/1 28/1	sain guéri de TC			
19		3/12				
20		31/12 13/1	TC	clindamycine + aérosol gentamicine	BBS II	
21		10/12 7/1	TC	clindamycine		
24		3/12				
GROUPE II 25/02/200	27	5/2 17/2				BBS I
	28	5/2 17/2				BBS I
	29		16/2			BBS I
	30		16/2			BBS I
	31		4/1 14/1 18/2	TC	doxycycline	BBS II
	32		13/1 18/2			
	33	4/2				BBS I
	34	22/1				BBS I
	35	22/1				BBS I
	36	31/1	18/2			
37	31/1	18/2			BBS I	
38		26/1 18/2				
GROUPE III 25/02/2000	41		4/2			
	42		4/2			
	43		7/1 25/1 11/2	TC		BBS II
	44					BBS I
	45					BBS I
	46					BBS I
	47		8/2	TC		BBS II
	48		25/1			BBS II
	49	31/1				BBS I
	50		23/12 11/1 11/2			
51		13/1				
52		21/1 4/2			BBS II	
53		22/1 5/2	TC			
54		22/1 5/2	TC		BBS II	
55		21/1 9/2				
GROUPE IV 09/03/2000	57		19/11	TC	amoxicilline-ac.clavul +marbofloxacin	
	58		3/1 20/1 11/2	TC	amoxicilline-ac.clavul +marbofloxacin	
	59		22/12 11/1	TC	amoxicilline-ac.clavul +marbofloxacin	BBS II
	60		4/2 25/2	TC	amoxicilline-acide clavulanique	BBS II
	61		27/1 18/2	TC	amoxicilline-acide clavulanique	BBS II
	62		23/2	TC	amoxicilline-acide clavulanique	
	63	1/3				
	64		18/2 3/3		doxycycline	
	65		26/2			
	66		8/2 3/3			
67		20/2				

Tableau 8. Vaccins CHP, CHPPi et traitements

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Nous avons isolé et typé *BBS* chez des chiens mis à la vente dans quatre animaleries. Une analyse de l'immunité induite dans cette population par les vaccins Pneumodog et Intra-trac I a été réalisée dans un second temps.

Les prélèvements ont été effectués en collaboration avec les Docteurs Vétérinaires Sophie Lemonier, Jean-Marie Sirieix et Xavier Bastian. Les isolements, analyses et typages ont été réalisés au Centre National de Référence des Bordetelles à l'Institut Pasteur sous la direction du Docteur Nicole Guiso.

I. MATERIEL ET METHODES

1. Population étudiée

L'étude porte sur une population de 58 chiens répartis dans quatre points de vente appartenant à une même enseigne.

Les indications concernant le sexe, la race, l'âge, les vaccinations, l'état clinique et les éventuels traitements sont regroupées dans les tableaux 8, 9 et 10. Les chiots proviennent en majorité de chenils d'élevages, directement ou par l'intermédiaire de grossistes. Quelques chiots sont issus de petits élevages amateurs.

L'architecture et l'infrastructure des quatre magasins sont identiques. Les box contiennent deux à trois chiots, souvent regroupés en fonction de leur chenil d'origine. Les box ont des parois en verre et possèdent chacun un système d'aération individuel. Un local de quarantaine est réservé aux animaux malades.

Dans chaque magasin, les prélèvements ont été effectués sur la totalité de l'effectif.

Deux chats atteints d'une dermatophytie ont été inclus dans l'étude. Ils étaient hospitalisés dans le local de quarantaine en contact avec des chiens atteints de toux de chenil mais ne présentaient aucun signe d'infection respiratoire.

Des prélèvements ont également été effectués à l'entrée du conduit d'aération de quatre box.

Une épidémie de toux de chenil sévissait dans les magasins I et IV. Les magasins II et III présentaient quelques cas isolés de toux de chenil.

2. Technique de prélèvement

Le lavage bronchoalvéolaire est la technique de prélèvement idéale parce qu'il permet d'éviter la contamination par la flore saprophyte des voies aériennes supérieures. Dans cette enquête, l'écouvillonnage nasal ou pharyngé a été préféré au lavage bronchoalvéolaire parce que moins invasif et plus facile à mettre en œuvre dans le cadre d'une étude sur le terrain. *BBS* se développant essentiellement sur l'épithélium cilié, nous avons choisi d'effectuer les prélèvements dans les cavités nasales plutôt que dans l'oropharynx (à l'exception de quelques chiens et des deux chats).

O	RACE	S	AGE	PNEUMODOG	INTRATRAC	BBS	TYPE	CLINIQUE	PREL. ANTIBIO	BBS	PRN
GROUPE I 28/01/200											
A 1	Labrador	F	15/11/99	30/12 21/01	1			TC	N		
B 2	Labrador	F	19/10/99	21/11	2			TC	N		
A 3	Labrador	F	15/11/99	30/12 21/01	3			TC	N		
C 4	Bouledogue fr.	F	17/11/99		21/1	BBS II	sauvage	TC	N	BBS II	+
C 5	Bouledogue fr.	M	17/11/99		21/1	BBS II / I	sauv. / vaccin	TC	N	BBS II / I	+/+
6	Chat persan		3 mois		5			sain	OP		- / +
D 7	Cocker spaniel	M	25/09/99		6/12	BBS II	sauvage	sain guéri de TC	OP	BBS II	+
D 8	Cocker spaniel	M	26/10/99		17/1	BBS II	sauvage	sain contact avec 7	OP/N	BBS II	+
9	Golden retriever	M	05/11/99		21/1			sain	N		
E 10	Cairn terrier	F	08/09/99	3/11 14/11 30/12	10			sain	N		
11	Cocker spaniel	F	26/10/99		17/12			sain	N		
B 12	Labrador	M	21/11/99	27/12 16/01	12			sain	N		
13	Bichon	F	05/10/99	19/11	13			TC	N		
F 15	Caniche	M	02/10/99	4/12	15	BBS II	sauvage	sain guéri de TC	OP	BBS II	+
B 16	Labrador	F	21/11/99	27/12 18/01	16			sain	N		
17	Bichon	M	16/09/99	29/11 9/12	17	BBS II	sauvage	sain	N	BBS II	+
18	Cocker spaniel	F	15/10/99	10/12	18			sain guéri de TC	N		
G 19	Bichon	F	15/11/99	3/01 17/01	19			sain	OP		
H 20	Lhasa apso	M	30/10/99	19/12	20	BBS II	sauvage	TC	N	BBS II	+
21	Cocker	F	22/10/99	7/1	21			TC	N		
G 24	Bichon	M	15/11/99	3/01 17/01	24			sain	OP		
25	Chat persan		4 mois		25			sain	OP		
26	Chat persan		4 mois		26			sain	OP		
GROUPE II 25/02/200											
I 27	Lhasa apso	M	16/12/99		08/01 17/02	BBS I	vaccin	sain	N	BBS I	
I 28	Lhasa apso	M	18/12/99		08/01 17/02	BBS I	vaccin	sain	N	BBS I	
J 29	Cav. King Charles	M	17/12/99	16/2	28	BBS I	vaccin	sain	N	BBS I	
J 30	Bouledogue fr.	F	13/12/99	16/2	30	BBS I	vaccin	sain	N	BBS I	
K 31	Labrador	M	15/11/99	14/01 25/01	31	BBS II	sauvage	TC	N	BBS II	+
L 32	Shih tzu	F	11/11/99		13/01 4/02			sain	N		
M 33	Cairn Terrier	F	18/12/99	4/2	18/2	BBS I	vaccin	sain	N	BBS I	
M 34	Lhasa apso	M	04/12/99	22/1	18/2	BBS I	vaccin	sain	N	BBS I	
M 35	Lhasa apso	F	04/12/99	22/1	18/2	BBS I	vaccin ?	sain	N	BBS I	
N 36	Aïoli	M	07/12/99	19/01 9/02	11/2			sain	N		
N 37	Aïoli	F	07/12/99	19/01 09/02	11/2	BBS I	vaccin ?	sain	N	BBS I	
D 38	Cocker spaniel	M	21/11/99		18/1			sain	N		
39	Aération				39						
40	Aération				40						

Tableau 9. Isolement et typage de BBS dans les groupes I et II (O : chenil d'origine ; PREL : prélèvement ; N : nasal ; OP : oropharyngé)

Nous avons utilisé des écouvillons stériles, secs, montés sur une tige métallique souple. Le diamètre du bouton est d'environ 2 mm. Ces écouvillons sont initialement destinés aux prélèvements urétraux chez l'homme (Consortium de Matériel pour Laboratoire, Nemours, France. Ecouvillon Tige Métallique Souple (ETMS)). Leur faible diamètre permet un écouvillonnage d'une profondeur de 2 à 5 cm même chez des animaux de petite taille ou des brachycéphales. La souplesse de la tige limite le risque de blessure dans le cas d'un animal agité.

Le transport a été réalisé à température ambiante et la mise en culture effectuée dans un délai compris entre 2 à 4 heures. *BBS* est un germe fragile et les prélèvements doivent être mis en culture le plus rapidement possible. Un délai supérieur à 24 heures impose l'utilisation d'un milieu de transport spécifique.

3. Méthodes d'isolement et d'identification

L'isolement de *BBS* à partir de produits biologiques provenant des cavités nasales est souvent rendu difficile par la présence d'une flore associée importante. Dans certaines circonstances, cette flore peut inhiber la croissance en culture de *BBS*. Les colonies de *BBS* se développent plus lentement que la plupart des autres bactéries et nécessitent un pH alcalin. Lorsque des bactéries fermentatrices créent des conditions défavorables en acidifiant le milieu de culture, les colonies de *Bordetella* sont en nombre réduit, leur morphologie est altérée et leur identification difficile. L'isolement est particulièrement difficile lorsque les *Bordetella* sont présentes en faible quantité dans les voies respiratoires, notamment chez les individus porteurs sains.

L'utilisation de milieux sélectifs pour *BBS* permet d'accroître la sensibilité diagnostique des cultures. Ces milieux sont caractérisés par un pH bas et contiennent des antibiotiques inhibant la croissance des bactéries à gram positive et des Enterobactéries. Le G20G développé par Smith et Baskerville (1979) contenant une association de pénicilline, furaltadone et gentamycine est adapté à l'isolement de *BBS* chez le porc. Son utilisation chez le chien était possible. La pauvreté de ce milieu risquait cependant de favoriser l'isolement de variants de phase.

Nous avons utilisé la gélose Chocolat-Haemophilus (Biomérieux, France). La sélectivité de cette gélose permet une bonne inhibition de la flore nasale par l'association de deux antibiotiques et d'un antifongique :

- la bacitracine et la vancomycine inhibent la plupart des bactéries à Gram + (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Clostridium*...)

- l'amphotéricine B (Fungizone) inhibe très fortement les levures.

Les prélèvements ont été étalés sur une gélose Chocolat Haemophilus et mis en culture à 36°C pendant 72 heures.

La gélose Chocolat-Haemophilus ne permettant pas de visualiser le caractère hémolytique des souches, celles ci ont été, dans un second temps, mises en culture sur un milieu de Bordet-Gengou.

L'identification des caractères biochimiques a été réalisée à l'aide d'une galerie API 20^F (Biomérieux, France).

4. Mise en culture du vaccin Intra-trac 1

O	RACE	S	AGE	PNEUMODOG	INTRATRAC	BBS	TYPE	CLINIQUE	PREL	ANTIBIO.	BBS	PRN	FHA	ACHy
GROUPE III 25/02/2000														
O 41	Labrador	M	05/12/99			41		sain	N					
O 42	Labrador	F	10/12/99			42		sain	N					
P 43	Shar pei	M	12/11/99		11/2	43	sauvage	TC	N		BBS II	+		
Q 44	Boxer	F	27/12/99		18/2	44	vaccin	sain	N		BBS I			
Q 45	Boxer	M	27/12/99		18/2	45	vaccin ?	sain	N		BBS I			
Q 46	Boxer	F	27/12/99		18/2	46	vaccin ?	sain	N		BBS I			
R 47	Golden retriever	M	09/12/99			47	sauvage	TC	N		BBS II	+		
R 48	Bichon	M	22/11/99			48	sauvage	sain	N		BBS II	+		
S 49	Aidi	M	07/12/99	19/1 9/2	11/2	49	vaccin ?	sain	N		BBS I			
T 50	Malinoie	F	07/11/99	23/12 21/01		50		sain	N					
U 51	Lhasa apco	M	19/01/99		11/2	51		sain	N					
V 52	WHWT	F	12/11/99		21/1	52	sauvage ?	sain	N		BBS II			
W 53	Loulou	M	20/11/99	22/01 5/02	18/2	53		TC	OP					
W 54	Loulou	F	12/11/99	22/01 5/02	18/2	54	sauvage ?	TC	N		BBS II			
X 55	Scottish terrier	F	22/12/99		18/2	55		sain	N					
56	Aération					56	sauvage ?		N		BBS II	+		
GROUPE IV 09/03/2000														
V 57	Lhasa apco	M	19/09/99		19/11	57		TC	N	+				
Y 58	Shih tzu	M	14/11/99	3/01 11/02		58		TC	N	+				
O 59	Labrador	M	22/10/99			59	sauvage	TC	N	+	BBS II			
O 60	Labrador	F	10/12/99	25/2		60	sauvage	TC	N	+	BBS II			
Z 61	Golden retriever	F	08/12/99	18/2		61	sauvage	TC	N	+	BBS II			
AB 62	Carlin	M	21/12/99	23/2		62		TC	N	+				
AB 63	Bull terrier	M	29/12/99			63		sain	N					
CD 64	Cocker amer.	M	17/12/99	18/02 3/03		64		sain	N	+				
EF 65	Cocker amer.	F	08/01/00			65		sain	N					
GH 66	Cocker spaniel	F	21/12/99	3/3		66		sain	N					
GH 67	Cocker spaniel	M	28/02/00			67		sain	N					
68	Aération					68			N					
69	Intra-trac 1					69	vaccin				BBS I	+		+

Tableau 10. Isolement et typage de BBS dans les groupes III et IV

(O : chien d'origine ; PREL : prélèvement ; N : nasal ; OP : oropharyngé ; WHWT : West Highland White Terrier)

Un vaccin Intra-trac I provenant d'une centrale d'achat vétérinaire a été reconstitué et mis en culture dans des conditions identiques à celles des prélèvements collectés chez les chiens.

5. Recherche des facteurs de virulence

L'expression des facteurs de virulence PRN, FHA et AC-Hly a été recherchée par immunoempreinte selon la méthode décrite par Gueirard (1993). Les protéines bactériennes sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les facteurs de virulence sont mis en évidence par fixation avec des anticorps spécifiques : anti-PRN, anti-FHA et anti-AC-Hly.

6. Typage par Electrophorèse en champ pulsé.

Le typage par ECP a été réalisé selon la méthode décrite par Gueirard (1995).

Les étapes principales sont les suivantes :

- inclusion des bactéries dans un gel d'agarose,
- digestion de l'ADN chromosomique par les enzymes de restriction *Spe I* ou *Xba I*,
- électrophorèse par la méthode du CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Fields),
- révélation par le bromure d'éthidium et photographie du gel.

7. Discrimination entre les souches sauvages et les souches d'origine vaccinale

Le vaccin Intra-trac I est un vaccin vivant atténué. Son administration intranasale entraîne la colonisation du tractus respiratoire du chien par la souche vaccinale.

Lorsque *BBS* est isolée chez un chien, il peut donc s'agir soit d'une souche sauvage, soit d'une souche vaccinale.

Plusieurs éléments peuvent aider à déterminer l'origine (sauvage ou vaccinale) de la souche isolée : l'anamnèse, l'état clinique du chien, le typage biochimique et génétique des souches.

Ces éléments ne sont que des éléments d'orientation et ne peuvent séparément permettre d'affirmer de manière catégorique l'origine des isolats. Pris en compte dans leur ensemble, ils peuvent cependant donner l'origine la plus probable de chaque isolat.

7.1. Anamnèse

Une vaccination récente avec le vaccin Intra-trac I est en faveur d'une origine vaccinale. Un chien non vacciné peut également avoir été contaminé par un chien vacciné et être porteur de la souche vaccinale. L'existence d'une épidémie dans le magasin ou une notion de contact avec un chien atteint de toux de chenil (provenant du même chenil d'élevage) sont en faveur de l'isolement d'une souche sauvage.

7.2. Etat clinique

La présence de symptômes de toux de chenil (TC) est en faveur d'une infection par une souche sauvage, l'absence de symptôme en faveur d'une origine vaccinale. Un chien peut cependant être porteur asymptomatique d'une souche sauvage ou présenter des symptômes suite à une réaction vaccinale.

7.3. Phénotype

Le phénotype de l'isolat est comparé avec le phénotype de la souche vaccinale mise en culture. Cette souche Intra-trac 1 (69) est en phase I alors que les souches sauvages sont habituellement en phase II ou en phase intermédiaire (Guiso, communication personnelle).

7.4. Electrophorèse en champ pulsé

Le profil en ECP de l'isolat est comparé avec celui de la souche vaccinale mise en culture.

Un profil d'électrophorèse en champ pulsé ou pulsotype est défini par l'ensemble des fragments d'ADN d'un isolat obtenus après clivage par une enzyme de restriction. L'utilisation en parallèle de deux enzymes, *Spe* I et *Xba* I, permet de confirmer ou d'infirmer les résultats trouvés avec chaque enzyme.

L'ECP est une technique très discriminante. En théorie, deux isolats présentant des profils différents devraient être considérés comme ayant une origine différente. Des événements génétiques peuvent cependant avoir lieu lors de la multiplication bactérienne et entraîner des différences plus ou moins importantes par rapport au profil initial :

- l'insertion d'un fragment d'ADN va augmenter la taille d'une des bandes. La différence entre les deux souches sera alors de deux bandes.
- la délétion d'un fragment à l'intérieur d'une bande va générer une diminution de la taille de celle-ci. La différence d'un profil contenant ou non cette délétion sera de deux bandes.
- plus rarement, la mutation d'une base peut créer ou faire disparaître un site de restriction. Cet événement va générer trois bandes de différences entre les souches.

Nous avons utilisé quatre classes de profils :

- profils identiques : les isolats ont la même origine.
- profils proches ou très peu différents : on observe deux ou trois bandes de différence (correspondant à un événement génétique). Les isolats ont probablement la même origine.
- profils différents : on observe 4 à 6 bandes de différence (correspondant à deux événements génétiques). Les isolats peuvent avoir une origine différente.
- profils très différents : six à neuf fragments de restriction ou plus (correspondant à au moins trois événements génétiques). Les isolats n'ont pas la même origine.

8. Détermination de la dose létale 50 par infection respiratoire dans le modèle murin (Vaccin Intra trac 1)

Des injection intranasales de 50 µl de dilution croissante (7.10^6 , 7.10^7 et 7.10^8 CFU/ml) d'une suspension de *BBS* de la souche vaccinale Intra-trac 1 sont réalisées sur trois groupes (1, 2 et 3) de 10 souris Swiss âgées de 3 à 4 semaines.

Dans chaque groupe on dénombre les souris décédées sur une période de 30 jours. La dose létale 50 (DL50) est déterminée en établissant une courbe semi-logarithmique en fonction des quantités de bactéries utilisées et du nombre de souris décédées.

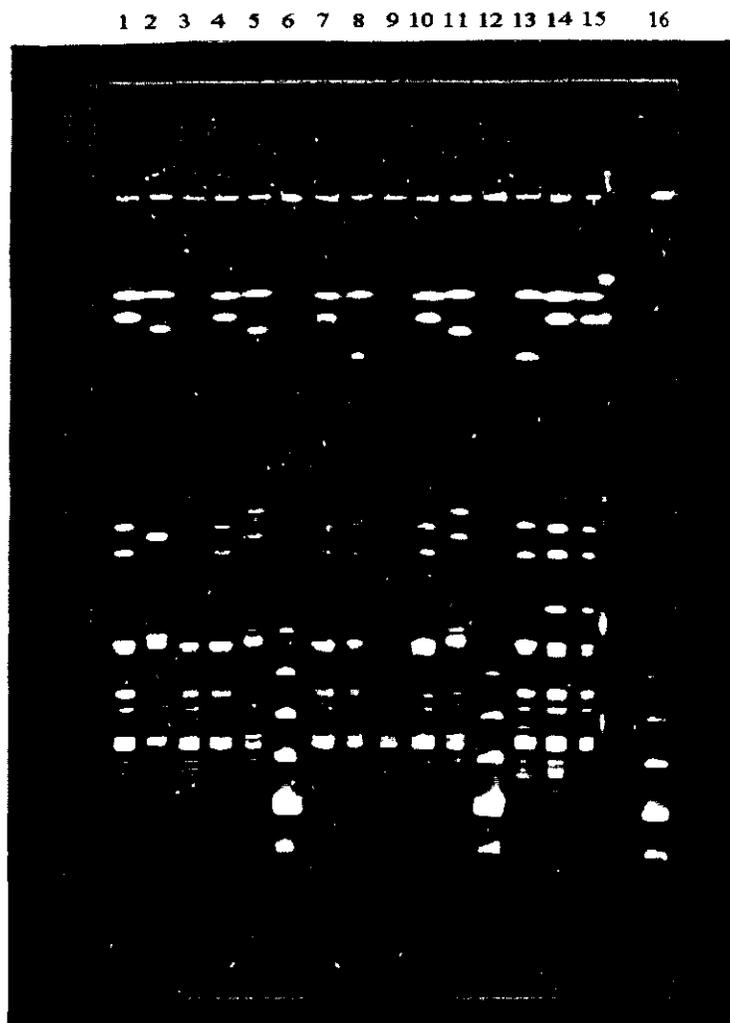


Figure 4. Profils en ECP après restriction avec *Spe* I (1 mars 2000)

Ligne 1, isolat 4 ; ligne 2, isolat 5H⁺ ; ligne 3, isolat 5H⁻ ; ligne 4, isolat 7 ; lignes 5 et 11, isolat de référence R ; lignes 6, 12 et 16, bactériophage lambda ; ligne 7, isolat 8 ; ligne 8, isolat 15 ; ligne 9, isolat 17 ; ligne 10, isolat 20 ; ligne 13, isolat 23 ; lignes 14 et 15, isolats de référence 038 et 376.

II. RESULTATS

1. Résultat global

1.1. Nombre d'isolats de *Bordetella bronchiseptica* collectés

BBS a été isolée chez 28 des 58 chiens prélevés (soit 29 isolats, le chien 5 étant porteur de deux souches distinctes)(Tableaux 9 et 10).

BBS a également été isolée à l'entrée du conduit d'aération d'un des box (isolat 56).

La souche 69 résulte de la mise en culture du vaccin Intra-trac I.

1.2. Phénotype des isolats

En fonction de l'aspect des colonies sur le milieu de Bordet-Gengou (cf Caractères cultureux) et de l'expression des facteurs de virulence, nous avons déterminé la phase des isolats :

- 13 isolats sont en phase I : hémolyse et expression des facteurs AC-Hly, FHA et PRN,
- 17 isolats sont en phase II : absence d'hémolyse et expression des facteurs FHA et PRN,
- la souche vaccinale Intra-trac I (69) est en phase I.

2. Etude par groupe

Afin de déterminer l'origine vaccinale ou sauvage des isolats nous avons étudié dans chaque groupe :

- les relations existant entre la phase des isolats, l'état clinique du chien et son statut vaccinal,
- les profils en ECP (Figures 4, 5, 6, 7 et 8).

2.1. Groupe I

Epidémiologie

Une épidémie de toux de chenil sévit dans le magasin depuis plusieurs semaines.

Les chiens 1, 2, 3, 4, 5, 13, 20 et 21 sont atteints de TC.

Les chiens 7,15 ont présenté des symptômes de TC les deux semaines précédant le prélèvement mais n'en présentent plus le jour du prélèvement.

Les chiens 4 et 5 proviennent d'un même élevage.

Les chiens 7 et 8 proviennent d'un même élevage.

Phases

BBS est isolée chez les chiens 4, 5, 7, 8, 15, 17 et 20.

Les isolats 4, 5, 7, 8, 15, 17 et 20 sont en phase II.

Deux isolats sont collectés chez le chien 5 : un isolat en phase I, hémolytique (5H+) sur le milieu de Bordet-Gengou et un isolat en phase II, non hémolytique (5H-).

Relation entre la phase de l'isolat et l'état clinique du chien

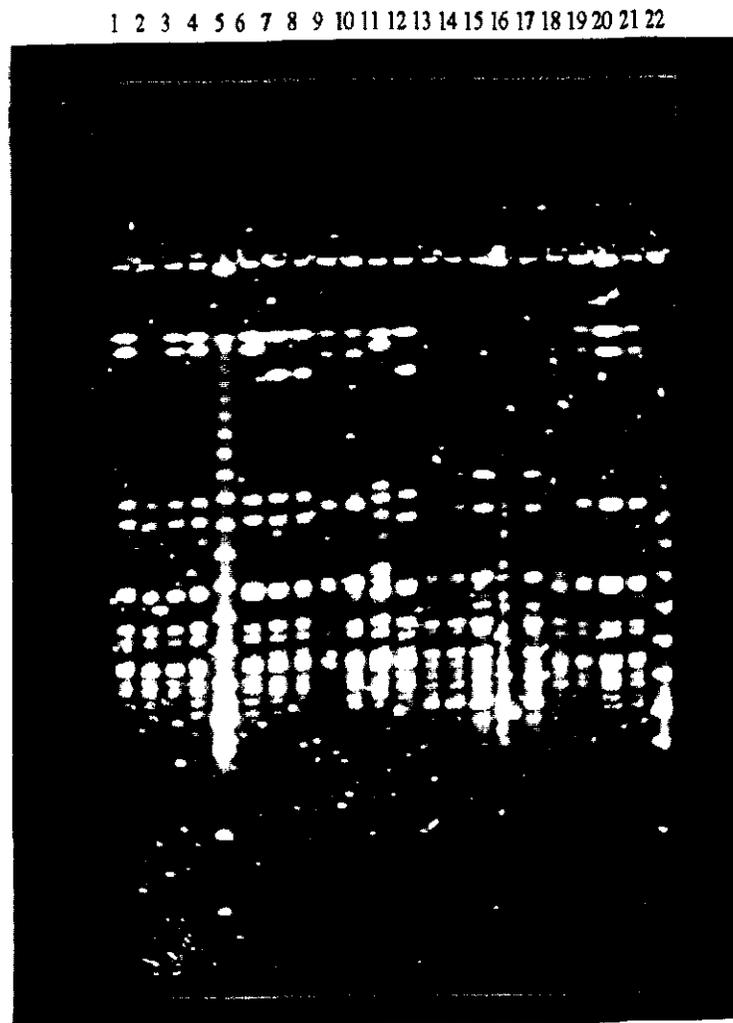


Figure 5. Profils en ECP après restriction avec *Spe* I (14 avril 2000)

Ligne 1, isolat 4 ; ligne 2, isolat 5H- ; ligne 3, isolat 7 ; ligne 4, isolat 8 ; lignes 5, 16 et 22, bactériophage lambda ; ligne 6, isolat 20 ; ligne 7, isolat 15 ; ligne 8, isolat 17 ; ligne 9, isolat 5H- ; lignes 10 et 21, vaccin Intra-trac 1 ; ligne 11, isolat de référence 286 ; ligne 12, isolat 23 ; ligne 13, isolat 27 ; ligne 14, isolat 28 ; ligne 15, isolat 29 ; ligne 17, isolat 30 ; ligne 18, isolat 31 ; ligne 19, isolat 33 ; ligne 20, isolat 34.

Les isolats en phase II proviennent de 3 chiens atteints de TC (4, 5, 20), 2 chiens guéris d'une TC (7, 15), un chien (8) asymptomatique mais en contact avec le chien (7) guéri d'une TC et un chien sain (17).

Relation entre la phase de l'isolat et une vaccination avec Intra-trac 1

L'isolat en phase I est collecté chez le chien 5 vacciné avec Intra-trac 1 sept jours avant le prélèvement.

Les isolats 4, 5 et 8, en phase II, sont collectés chez des chiens (4, 5 et 8) vaccinés avec Intra-trac 1 sept à onze jours auparavant, chez un chien (7) vacciné sept semaines auparavant et chez deux chiens (15 et 16) non vaccinés avec Intra-trac 1.

Comparaison des profils en ECP

Les profils 4, 5H-, 7, 8 et 20 sont identiques ou très peu différents selon les enzymes de restriction (série 1).

Les profils de la série 1 sont très différents du profil vaccinal.

Les profils 15 et 17 (série 2), sont identiques ou très peu différents selon les enzymes de restriction. Les profils de la série 2 sont très différents du profil vaccinal.

Les profils de la série 1 et de la série 2 sont différents.

Le profil 5H+ est identique au profil vaccinal.

Conclusion pour le groupe I

D'après les données cliniques et épidémiologiques, les critères phénotypiques et les profils en ECP :

- l'isolat 5H+ semble correspondre à la souche vaccinale,
- les isolats 4, 5H-, 7, 8, 15, 17 et 20 ne semblent pas correspondre la souche vaccinale,
- les isolats 4, 5H-, 7, 8 et 20 semblent correspondre à une même souche épidémique (souche 1),
- les isolats 15 et 17 semblent correspondre à une même souche épidémique (souche 2).

Le fait que les souches 1 et 2 évoluent dans une population de chiens confinés dans un même lieu est en faveur d'une identité entre ces souches. Elles ont cependant des profils qui diffèrent de 4 bandes en *Spe I* et 6 bandes en *Xba I*.

On ne peut exclure la possibilité qu'il s'agisse d'une même souche épidémique. Il est possible que ces deux souches soient des clones issus d'une même souche et que l'un des clones ait subi un ou plusieurs événements génétiques.

L'autre possibilité est que ce soient deux souches sauvages ayant des origines différentes et évoluant de concert dans l'effectif.

2.2. Groupe II

Epidémiologie

L'état sanitaire du chenil est excellent.

Le chien 31 est atteint d'une forme bénigne de TC.

Les chiens 27 et 28 proviennent d'un même élevage.

Les chiens 29 et 30 proviennent d'un même élevage.

Les chiens 33, 34, 35 proviennent d'un même élevage.

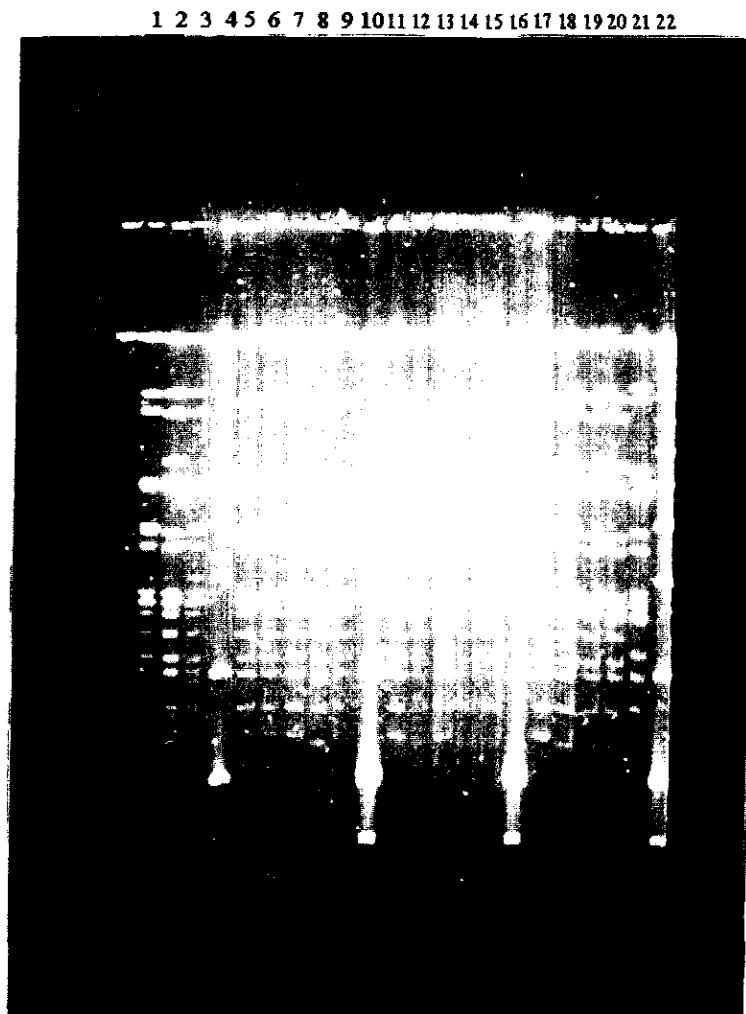


Figure 6. Profils en ECP après restriction avec *Spe* I (22 mai 2000)

Ligne 1, isolat 5H- ; ligne 2, isolat 17 ; ligne 3, isolat 23 ; lignes 4, 10, 16 et 22, bactériophage lambda ; lignes 5, 11 et 17, vaccin Intra-trac 1 ; ligne 6, isolat 29 ; ligne 7, isolat 30 ; ligne 8, isolat 31 ; ligne 9, isolat 34 ; ligne 12, isolat 43 ; ligne 13, isolat 44 ; ligne 14, isolat 47 ; ligne 15, isolat 48 ; ligne 18, isolat 59 ; ligne 19, isolat 60 ; ligne 20, isolat 61 ; ligne 21, isolat de référence 286.

Phases

BBS est isolée chez les chiens 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35 et 37.

Les isolats 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35 et 37 sont en phase I.

L'isolat 31 est en phase II.

Relation entre la phase de l'isolat et l'état clinique du chien

Tous les isolats en phase I (27, 28, 29, 30, 33, 34, 35 et 37) sont collectés chez des chiens sains.

L'isolat 31, en phase II, est collecté chez un chien atteint de TC.

Relation entre la phase de l'isolat et une vaccination avec Intra-trac 1

Les isolats 27, 28, 33, 34, 35 et 37, en phase I, sont collectés chez des chiens ayant été vaccinés avec Intra-trac 1 sept à quinze jours avant la date du prélèvement.

Les isolats 29 et 30, en phase I, sont collectés chez des chiens non vaccinés avec Intra-trac 1.

L'isolat 31, en phase II, est collecté chez un chien non vacciné avec Intra-trac 1.

Comparaison des profils en ECP

Les profils 27, 28, 29, 30, 33 et 34 sont identiques ou très peu différents, selon les enzymes de restriction, du profil vaccinal.

Le profil 31 est très différent du profil vaccinal.

Conclusion pour le groupe II

D'après les données cliniques et épidémiologiques, le phénotype des isolats et les profils en ECP :

- les isolats 27, 28, 29, 30, 33 et 34 semblent correspondre à la souche vaccinale,
- l'isolat 31 ne semble pas correspondre à la souche vaccinale.

2.3. Groupe III

Epidémiologie

Le chenil est dans un bon état sanitaire.

Les chiens 43, 47, 53 et 54 sont atteints de formes bénignes de TC.

Les chiens 44, 45 et 46 proviennent d'un même élevage.

Les chiens 47 et 48 proviennent d'un même élevage.

Phases

BBS est isolée chez les chiens 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 52, 54 et dans la gaine d'aération (56).

Les isolats 44, 45, 46 et 49 sont en phase I.

Les isolats 43, 47, 48, 52, 54 et 56 sont en phase II.

Relation entre la phase de l'isolat et l'état clinique du chien

Tous les isolats en phase I sont collectés chez des chiens sains.

Les isolats 43, 47 et 54, en phase II, sont collectés chez des chiens atteints de TC.

L'isolat 48, en phase II, est collecté chez un chien sain mais qui vient du même élevage que le chien 47 atteint de TC.

L'isolat 52, en phase II, est collecté chez un chien sain.

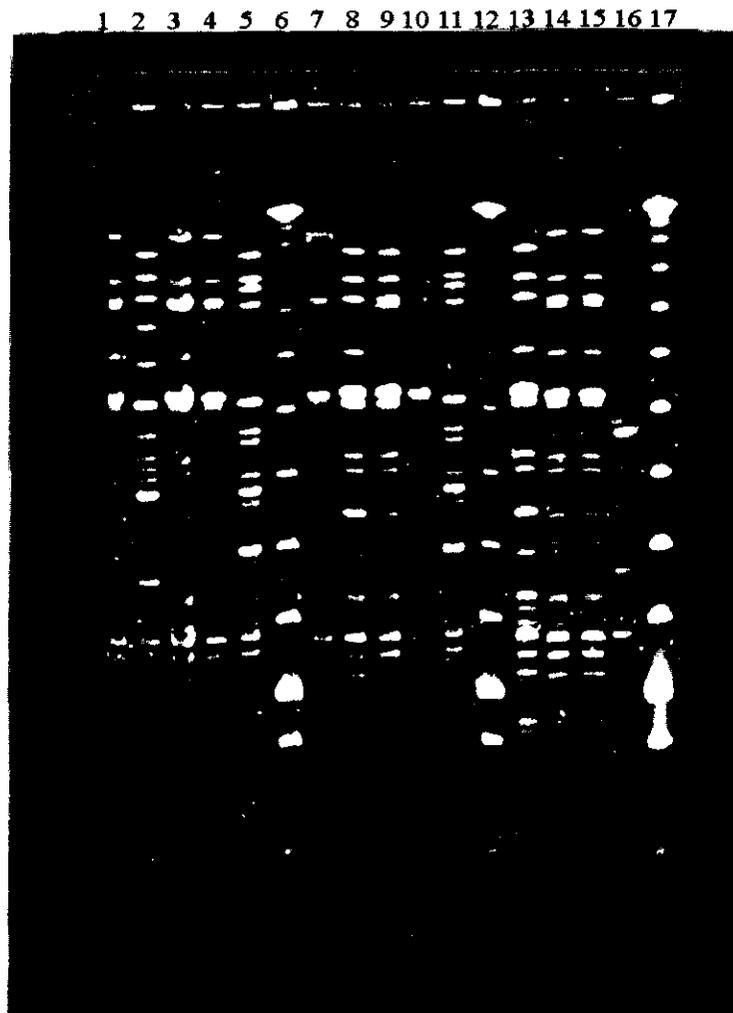


Figure 7. Profils en ECP après restriction avec *Xba* I (7 mars 2000)

Ligne 1, isolat 4 ; ligne 2, isolat 5H+ ; ligne 3, isolat 5H- ; ligne 4, isolat 7 ; lignes 5 et 11, isolat de référence R ; lignes 6, 12 et 17, bactériophage lambda ; ligne 7, isolat 8 ; ligne 8, isolat 15 ; ligne 9, isolat 17 ; ligne 10, isolat 20 ; ligne 13, isolat 23 ; lignes 14, 15 et 16, isolats de référence 038, 376 et Lord.

Relation entre la phase de l'isolat et une vaccination avec Intra-trac 1.

Les isolats 44, 45, 46 et 49, en phase I, sont collectés chez des chiens ayant été vaccinés avec Intra-trac 1 sept à quatorze jours avant la date du prélèvement.

Les isolats 43, 52 et 54, en phase II, sont collectés chez des chiens ayant été vaccinés avec Intra-trac 1 respectivement deux, cinq et une semaines avant la date du prélèvement.

Les isolats 47 et 48, en phase II, sont collectés chez des chiens non vaccinés avec Intra-trac 1.

Comparaison des profils en ECP

Le profil 44 est identique ou très peu différent, selon la restriction, du profil vaccinal.

Les profils 47 et 48 sont identiques.

Le profil 43 est très peu différent des profils 47 et 48.

Les profils 43, 47 et 48 sont très différents du profil vaccinal.

Conclusion pour le groupe III

D'après les données cliniques et épidémiologique, le phénotype des isolats et les profils en ECP :

- l'isolat 44 semble correspondre à la souche vaccinale,
- les isolats 43, 47 et 48 ne semblent pas correspondre à la souche vaccinale,
- les isolats 47 et 48 semblent correspondre à une même souche épidémique (chiens issus du même chenil).

Le profil 43 est très proche (1 bande avec *Spe* I et 2 bandes avec *Xba* I) des profils 47 et 48 et les données épidémiologiques sont en faveur d'une identité entre les 3 souches.

Il est probable que l'isolat 43 soit un clone issu de la souche 47 ou 48 ayant subi un événement génétique.

Il est possible que les chiens 47 et 48 aient été contaminés dans leur chenil d'origine et que le chien 43, originaire d'un chenil différent, ait été contaminé dans l'animalerie par le chien 47 ou le chien 48.

2.4. Groupe IV

Epidémiologie

La toux de chenil est présente de manière endémique dans le magasin.

Les chiens 57, 58, 59, 60, 61 et 62 sont atteints de TC.

Les chiens 59 et 60 proviennent du même élevage.

Phases

BBS est isolée chez les chiens 59, 60 et 61.

Les isolats sont en phase II.

Relation entre la phase de l'isolat et l'état clinique du chien.

Les isolats en phases II sont collectés chez des chiens atteints de TC.

Relation entre la phase de l'isolat et une vaccination avec Intra-trac 1.

Les isolats en phase II sont collectés sur des chiens non vaccinés avec Intra-trac 1.

Le chien 57 a été vacciné avec Intra-trac 1 mais la vaccination remonte à plus de trois mois.

BBS n'a pas été isolée chez ce chien.

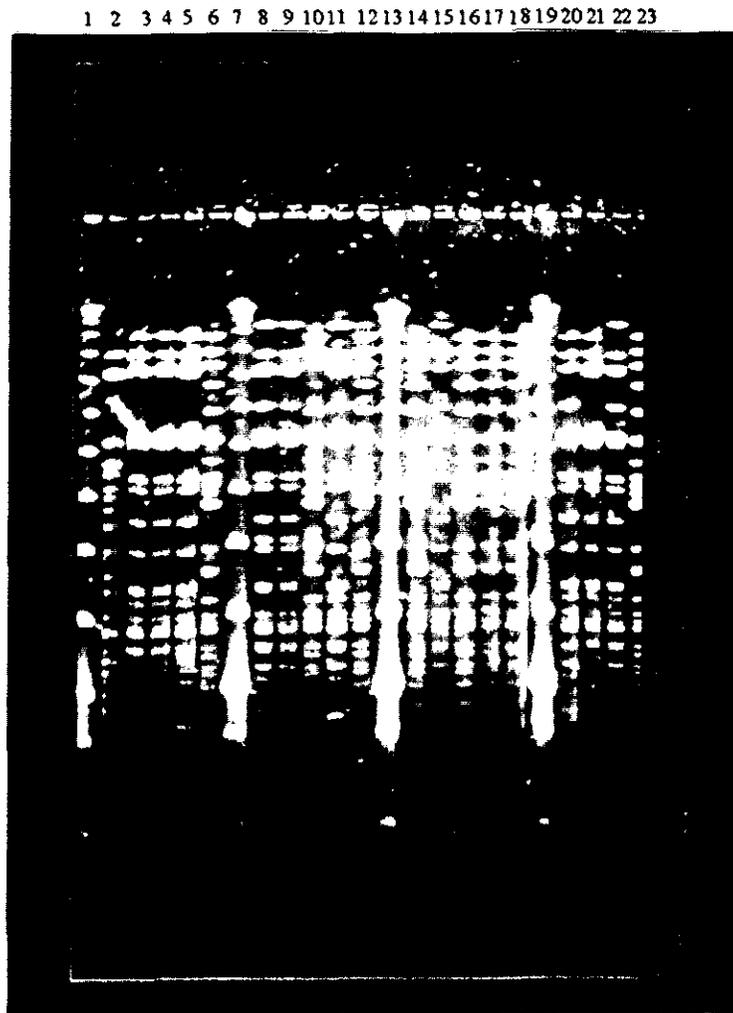


Figure 8. Profils en ECP après restriction avec *Xba* I (11 mai 2000)

Lignes 1, 7, 13 et 19, bactériophage lambda ; ligne 2, isolat de référence 286 ; ligne 3, isolat 61 ; ligne 4, isolat 60 ; ligne 5, isolat 59 ; lignes 6, 12 et 18, vaccin Intra-trac 1 ; ligne 8, isolat 48 ; ligne 9, isolat 47 ; ligne 10, isolat 44 ; ligne 11, isolat 43 ; ligne 14, isolat 34 ; ligne 15, isolat 31 ; ligne 16, isolat 30 ; ligne 17, isolat 29 ; ligne 20, isolat 23 ; ligne 21, isolat 17 ; ligne 22, isolat 5H- ; ligne 23, isolat 5H+.

Comparaison des profils en ECP

Les profils des isolats 59, 60 et 61 sont identiques.
Ces profils sont très différents du profil vaccinal.

Conclusion groupe IV

D'après les données cliniques et épidémiologiques, le phénotype des isolats et les profils en ECP :

- les isolats 59, 60 et 61 ne semblent pas correspondre à la souche vaccinale.
- les isolats 59, 60 et 61 semblent correspondre à une même souche épidémique.

Conclusion portant sur l'effectif total

D'après les données cliniques, épidémiologiques et les profils en ECP :

- les isolats en phase I semblent tous correspondre à une souche vaccinale,
- les isolats en phase II semblent tous correspondre à des souches sauvages différentes de la souche vaccinale.

Pour des raisons pratiques, les profils en ECP n'ont pas pu être réalisés sur les isolats 35, 37, 45, 46, 49, 52, 54 et 56.

Les isolats 35, 37, 45, 46 et 49 sont en phase I, ils proviennent de chiens sains et vaccinés récemment avec Intra-trac 1. Il est très probable que ces isolats correspondent à la souche vaccinale et nous les considérerons comme tels dans la suite de l'étude.

L'isolat 52 est en phase II, provient d'un chien sain et vacciné mais la vaccination remonte à plus de 4 semaines. L'origine vaccinale est peu probable, même s'il n'est pas possible de l'éliminer complètement, en l'absence d'ECP.

L'isolat 54 est en phase II et provient d'un chien atteint de TC mais ce chien a été vacciné la semaine précédente. L'origine vaccinale est improbable mais ne peut être exclue en l'absence d'ECP.

L'isolat 56 est en phase II et provient du conduit d'aération de la cage hébergeant le chien 43 atteint de TC et porteur d'une souche non vaccinale. Ces éléments sont plutôt en faveur d'une origine non vaccinale.

3. Données concernant la virulence du vaccin Intra-trac 1 mis en culture

3.1. Phase

Sur le milieu de Bordet Gengou, la souche vaccinale (69) est en phase I. Elle possède un caractère hémolytique.

3.2. Expression des facteurs de virulence

La souche vaccinale (69) exprime les trois facteurs de virulence : AC-Hly, FHA et PRN.

3.3. Détermination de la DL50 par infection respiratoire dans le modèle murin

Trente jours après l'infection par la souche vaccinale (69):

- les 10 souris du groupe 1 (7.10^6 CFU/ml) sont vivantes,
- les 10 souris du groupe 2 (7.10^7 CFU/ml) sont vivantes,
- les 10 souris du groupe 3 (7.10^8 CFU/ml) sont décédées.

D'après la courbe semilogarithmique établie en fonction des quantités de bactéries utilisées (CFU/ml) et du nombre de souris décédées, la DL 50 par infection respiratoire dans le modèle murin du vaccin Intra-trac 1 est égale à 2.10^8 CFU/ml (Figure 9).

mortalité

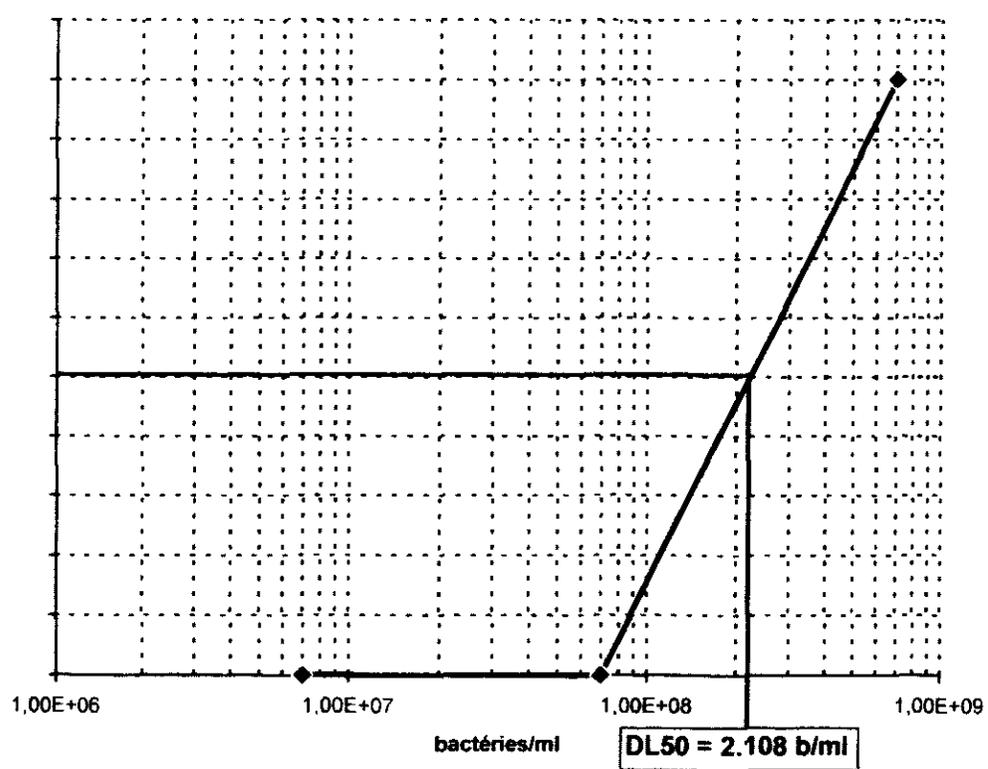


Figure 9 : détermination de la DL50 de la souche Intra-trac 1

III. DISCUSSION

1. Taux d'isolement de *Bordetella bronchiseptica*

Nous n'avons retenu que les souches différentes de la souche vaccinale.

Nombre total de chien : 58.

Nombre de chiens chez lesquels *BBS* II est isolée : 16.

BBS est isolée dans une conduite d'aération.

Nombre de chiens atteints de TC : 19.

Nombre de chiens atteints de TC et chez lesquels *BBS* II est isolée : 10.

Nombre de chiens atteints de TC et chez lesquels *BBS* II n'est pas isolée : 9.

Nombre de chiens guéris d'une TC : 3.

Nombre de chiens apparemment sains chez lesquels *BBS* II est isolée : 6.

1.1. Isolement de *BBS* chez les chiens atteints de toux de chenil

BBS est isolée chez 10 des 19 chiens présentant des signes cliniques de TC soit chez 52% des malades.

Chez 9 chiens atteints de TC, *BBS* n'est pas isolée. Il est possible que ces chiens ne soient pas infectés par *BBS* et que l'agent pathogène soit une bactérie différente de *BBS* ou un virus. Dans une collectivité, la probabilité pour que l'agent pathogène à l'origine d'une TC soit *BBS* est cependant forte. Il pourrait donc s'agir de chiens infectés par *BBS* chez lesquels les techniques de prélèvement et de culture n'ont pas permis l'isolement de la bactérie.

Dans l'hypothèse où tous les chiens atteints de TC étaient infectés par *BBS*, la sensibilité du diagnostic par mise en culture ne serait que de 52 %. En d'autres termes, il est probable qu'un chien infecté sur deux échappe au diagnostic par culture. Ce taux d'isolement se rapproche des taux d'isolement de *BP* obtenus chez l'homme. En milieu hospitalier, lorsque la mise en culture est réalisée immédiatement après le prélèvement, les taux d'isolement de *BP* peuvent atteindre 70 %.

Plusieurs éléments conditionnent l'obtention d'un taux d'isolement élevé.

- La technique de prélèvement : *BBS* étant localisée sur l'épithélium cilié, il est préférable d'effectuer l'écouvillonnage dans les cavités nasales plutôt qu'au niveau pharyngé.

- Une mise en culture rapide, dans les heures qui suivent l'écouvillonnage, est souhaitable. Chez l'homme, les pourcentages d'isolement de *BP* sont de 70 % lorsque la mise en culture est immédiate et 50 % après un délai de deux heures.

- L'utilisation d'un milieu spécifique augmente considérablement la sensibilité de la culture.

- Prélever en début d'évolution de la maladie. En médecine humaine, les pourcentages d'isolement de *BP* sont de 70 % la première semaine, 20 % la deuxième semaine puis chutent très rapidement. La probabilité d'isoler *BBS* est faible sur des toux de chenil en fin d'évolution ou chroniques. Cela pourrait être le cas pour le chien 2 qui était en voie de guérison et pour le chien 57 qui présentait des symptômes depuis quatre mois.

1.2. Isolement de *Bordetella bronchiseptica* chez les chiens ne présentant aucun symptôme de toux de chenil

BBS est isolée chez 6 chiens qui ne présentent pas de signes cliniques de TC.

Il peut s'agir :

- de chiens guéris d'une TC et qui restent porteurs de la bactérie (chien 7 et 15),
- de chiens contaminés par *BBS* et qui sont en phase d'incubation ou qui resteront asymptomatiques.

Dans tous les cas, ces chiens peuvent transmettre la bactérie. Ce sont des réservoirs dont l'importance épidémiologique est majeure.

Le taux d'isolement de *BBS* chez les porteurs sains est probablement inférieur au taux d'isolement chez les chiens atteints de TC. Le nombre de porteurs sains pourrait être sous estimé.

1.3. Isolement de *Bordetella bronchiseptica* dans le conduit de ventilation

L'isolement de la bactérie à l'entrée de la gaine d'aération confirme les données bibliographiques sur la capacité de survie de *BBS* dans le milieu extérieur. L'environnement doit être considéré comme un réservoir potentiel de la bactérie.

2. Analyse préliminaire de l'immunité induite par les vaccins Pneumodog et Intra-trac 1

2.1. Vaccin Pneumodog

Le vaccin Pneumodog induit une immunité envers *BBS* et le virus parainfluenza canin, les deux agents majeurs de la toux de chenil.

Nous avons analysé, dans la population des chiens prélevés, la protection conférée par ce vaccin contre :

- la toux de chenil,
- l'infection par *BBS*,
- le portage asymptomatique de *BBS*.

17 chiens étaient vaccinés avec le vaccin Pneumodog selon le protocole préconisé par le fabricant : 1, 3, 10, 12, 16, 17, 19, 24, 31, 36, 37, 49, 50, 53, 54, 58, 64.

Les chiens 2, 13, 15, 18, 20, 21, 29, 30, 33, 34, 35, 60, 61, 62 et 66 n'avaient reçu qu'une seule injection de primovaccination et n'ont pas été inclus dans l'étude.

2.1.1. Protection contre la toux de chenil

6 chiens vaccinés avec le vaccin Pneumodog présentent des symptômes de TC au moment du prélèvement : 1, 3, 31, 53, 54, 58.

Les symptômes cliniques sont de gravité variable :

- chien 1 : fièvre, anorexie, dyspnée, toux,
- chien 3, 31 et 58 : toux fréquente, rhinite, dyspnée,
- chien 31 : toux fréquente, rhinite,
- chiens 53 et 54 : toux peu fréquente, rhinite.

Les chiens 53 et 54 étaient vaccinés avec le vaccin Intra-trac 1 et le vaccin Pneumodog. Ils présentent des symptômes moins marqués que les quatre autres chiens.

2.1.2. Protection contre l'infection par *Bordetella bronchiseptica*

BBS est isolée chez deux chiens (31, 54) vaccinés avec le vaccin Pneumodog et qui présentent des symptômes de TC.

2.1.3. Protection contre le portage asymptomatique de *Bordetella bronchiseptica*

BBS est isolée chez 5 chiens, vaccinés avec le vaccin Pneumodog, qui ne présentent pas de symptôme de TC. Le chien 17 est porteur d'une souche sauvage et les chiens 27, 28, 37, 49 sont porteurs d'une souche vaccinale Intra-trac 1. Ces chiens pourraient (l'état clinique n'a été évalué qu'au moment du prélèvement) être des porteurs sains.

2.2. Vaccin Intra-trac 1

Le vaccin Intra-trac 1 induit une immunité contre *BBS*. C'est un vaccin vivant atténué administré par voie intranasale. Il est constitué d'une souche vivante de *BBS*, la souche S-55. 26 chiens étaient vaccinés avec le vaccin Intra-trac 1 selon le protocole préconisé par le fabricant : 4, 5, 7, 8, 9, 11, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 43, 44, 45, 46, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 57. Certains, parmi ces chiens avaient été vaccinés deux fois : 27, 28, 32.

2.2.1. Protection contre la toux de chenil

6 chiens vaccinés avec le vaccin Intra-trac 1 présentent des symptômes de TC au moment du prélèvement : 4, 5, 43, 53, 54, 57. Le chien 7, vacciné avec le vaccin Intra-trac 1, avait présenté des symptômes graves de TC durant les 4 semaines précédant la date du prélèvement.

Les symptômes cliniques sont de gravité variable :

- chien 7 : fièvre, anorexie, dyspnée, toux,
- chiens 4, 5 et 57 : toux fréquente, dyspnée,
- chiens 43, 53 et 54 : toux peu fréquente, rhinite.

2.2.2. Protection contre l'infection par *Bordetella bronchiseptica*

BBS est isolée chez cinq chiens (4, 5, 7, 43, 54) vaccinés avec le vaccin Intra-trac 1 et qui présentent des symptômes de TC. Chez le chien 5 deux souches différentes sont isolées : une souche sauvage (*BBS* II) et une souche vaccinale (*BBS* I).

2.2.3. Protection contre le portage asymptomatique de *Bordetella bronchiseptica*

BBS est isolée chez deux chiens (8, 52), vaccinés avec le vaccin Intra-trac 1, qui ne présentent pas de symptôme de TC. Les isolats sont différents de la souche vaccinale. Ces chiens pourraient (l'état clinique n'a été évalué qu'au moment du prélèvement) être des porteurs sains.

2.3. Association des vaccins Pneumodog et Intra-trac1

5 chiens (36, 37, 49, 53, 54) étaient vaccinés avec les deux vaccins, Pneumodog et Intra-trac 1.

2.3.1. Protection contre la toux de chenil

Deux de ces chiens (53, 54) présentent des symptômes de TC.

2.3.2. Protection contre l'infection par *Bordetella bronchiseptica*

BBS est isolée chez le chien 54 qui présente des symptômes de TC.

2.3.3. Protection contre le portage asymptomatique de *Bordetella bronchiseptica*

Aucun porteur sain de *BBS* n'a été retrouvé chez les chiens vaccinés avec les deux vaccins.

Tableau 11. Isolement de la souche vaccinale Intra-trac 1 et intervalle entre la vaccination et le prélèvement

chiens	Intervalle vaccination-prélèvement	Isolement de la souche vaccinale (<i>BBS 1</i>)
4	1 semaine	négatif
5	1 semaine	positif
7	7,5 semaines	négatif
8	11 jours	négatif
9	1 semaine	négatif
11	6 semaines	négatif
27	2 vaccins : 7 semaines – 8 jours	positif
28	2 vaccins : 7 semaines – 8 jours	positif
32	2 vaccins : 6 semaines – 3 semaines	négatif
33	1 semaine	positif
34	1 semaine	positif
35	1 semaine	positif
36	1 semaine	négatif
37	1 semaine	positif
38	5,5 semaines	négatif
43	2 semaines	négatif
44	1 semaine	positif
45	1 semaine	positif
46	1 semaine	positif
49	2 semaines	positif
51	2 semaines	négatif
52	5 semaine	négatif
53	1 semaine	négatif
54	1 semaine	négatif
55	1 semaine	négatif
57	16 semaines	négatif

Conclusion

Dans cet effectif, des chiens vaccinés avec le vaccin Pneumodog ou le vaccin Intra-trac 1 présentent des symptômes de TC et / ou sont porteurs de *BBS*.

3. Données concernant l'innocuité du vaccin Intra-trac 1

3.1. Réactions vaccinales

Les chiens 33, 34, 35, 44, 45 et 46 présentent une très légère rhinite séreuse.

- ils avaient été vaccinés avec le vaccin Intra-trac I une semaine avant le prélèvement,
- la souche vaccinale est isolée chez ces chiens,
- aucune souche sauvage n'est isolée chez ces chiens.

Compte tenu de ces éléments, les symptômes mineurs observés pourraient être des réactions vaccinales. Le vaccin Intra-trac 1 semble cependant être bien toléré dans cet effectif.

3.2. Persistance de la souche vaccinale dans les cavités nasales des chiens vaccinés avec Intra-trac 1

Une approximation de la persistance de la souche vaccinale peut être faite par le laps de temps durant lequel il est possible d'isoler *BBS* dans les cavités nasales suite à la vaccination.

La souche vaccinale est isolée chez 13 des 26 chiens vaccinés avec le vaccin Intra-trac 1.

Le tableau 11 donne, pour chacun des 26 chiens, l'isolement de la souche vaccinale (positif ou négatif) et l'intervalle entre la vaccination et le prélèvement.

Synthèse des résultats :

- intervalle égal à 1 semaine : 10 positifs, 6 négatifs,
- intervalle égal à 11 jours : 1 négatif,
- intervalle égal à 2 semaines : 1 positif et 2 négatifs,
- intervalle égal à 3 semaines : 1 négatif,
- intervalle compris entre 5 et 16 semaines : 3 négatifs.

Dans cet effectif, le taux d'isolement de la souche vaccinale est maximal à une semaine, très réduit à deux semaines et nul à partir de trois semaines.

La souche vaccinale semble ne persister qu'une à deux semaines dans les cavités nasales.

Compte tenu de la faible sensibilité du diagnostic par culture, il est cependant possible que passé ce délai, les chiens soient encore porteurs de la bactérie, peut être de manière intracellulaire. Des prélèvements par brossage cellulaire et un diagnostic par PCR permettraient peut être une meilleure approximation de la durée du portage vaccinal.

3.3. Passage de la souche vaccinale de chien à chien

La souche vaccinale est isolée chez les chiens 29 et 30, non vaccinés avec le vaccin Intra-trac 1.

Ces deux chiens pourraient s'être contaminés au contact de chiens vaccinés. Une vaccination occulte pratiquée par l'éleveur et non signalée sur le carnet de vaccination est également possible quoique moins probable.

La souche vaccinale pourrait donc circuler dans une population par passage de chien à chien. Cela confirmerait les données du laboratoire qui commercialise le vaccin.

3.4. Caractère hémolytique et expression des facteurs de virulence

La souche 69 résultant de la mise en culture du vaccin Intra-trac 1 est en phase I (hémolytique) sur le milieu de Bordet-Gengou. L'expression des facteurs de virulence AC-Hly, FHA et PRN de cette souche est confirmée par immunoempreinte.

Race	BBS	Type	jour du prélèvement	jour de la vente	semaines suivant la vente
1 Labrador			TC	sain	sain
2 Labrador			TC	sain	sain
3 Labrador			TC	TC	TC
4 Bouledogue fr.	BBS II	sauvage	TC	TC	TC
5 Bouledogue fr.	BBS II / I	sauv / vaccin	TC		
6 Chat persan			sain		
7 Cocker spaniel	BBS II	sauvage	sain	sain	sain
8 Cocker spaniel	BBS II	sauvage	sain	sain	sain
9 Golden retriever			sain		
10 Cairn terrier			sain		
11 Cocker spaniel			sain	sain	sain
12 Labrador			sain	sain	sain
13 Bichon			TC		
15 Caniche	BBS II	sauvage	sain	sain	sain
16 Labrador			sain		
17 Bichon	BBS II	sauvage	sain	sain	sain
18 Cocker spaniel			sain	TC	TC
19 Bichon			sain	TC	TC
20 Lhassa apso	BBS II	sauvage	sain		
21 Cocker			TC		
24 Bichon			TC		
27 Lhassa apso	BBS I	vaccin	sain	sain	sain
28 Lhassa apso	BBS I	vaccin	sain	sain	sain
29 Cav. King Charles	BBS I	vaccin	sain	sain	sain
30 Bouledogue fr.	BBS I	vaccin	sain		
31 Labrador	BBS II	sauvage	TC		
32 Shih tzu			sain		
33 Cairn terrier	BBS I	vaccin	sain	sain	sain
34 Lhassa apso	BBS I	vaccin	sain	sain	TC
35 Lhassa apso	BBS I	vaccin ?	sain	sain	sain
36 Aidi			sain	sain	sain
37 Aidi	BBS I	vaccin ?	sain	sain	sain
38 Cocker spaniel			sain	sain	TC

GRUPE I 28/01/200

GRUPE II 25/02/200

Tableau 12. Etat clinique des chiens après la vente (groupes I et II)

Toutes les souches vaccinales isolées chez les chiens de l'étude sont en phase I. L'expression des facteurs de virulence AC-Hly, FHA et PRN est confirmée par immunoempreinte chez la souche vaccinale isolée chez le chien 5.

3.5. DL50 par infection respiratoire chez la souris

La DL 50 (2.10^8 CFU/ml) est élevée. Les DL50 des isolats cliniques de *BBS* sont cependant très variables. Gueirard *et al.* (1993) ont déterminé, sur 10 souches virulentes de *BBS*, des DL50 variant de 5.10^3 à 1.10^8 CFU/ml.

D'autre part, nous ne pouvons pas comparer avec la souche parentale, ne connaissant pas sa DL50.

En conclusion, la DL50 que nous avons déterminé ne permet pas de dire si la souche Intra-trac 1 est atténuée.

3.6. Stabilité de la souche vaccinale

BBS est une bactérie relativement instable en culture. Les souches initialement en phase I perdent rapidement leurs caractères de virulence et passent en phase intermédiaire ou en phase IV avirulente.

La souche vaccinale S-55 paraît remarquablement stable, en phase I :

- cultivée à partir du vaccin, elle est en phase I,
- isolée chez les chiens vaccinés, elle est en phase I. Par comparaison, toutes les souches sauvages isolées sont en phase II.

Dans notre étude, les pulsotypes des souches vaccinales isolées chez les chiens sont identiques au pulsotype de la souche vaccinale cultivée. Il serait nécessaire de mener une étude sur une population plus importante de chiens vaccinés. L'origine vaccinale des isolats peut être établi par typage après restriction avec l'enzyme *Spe* I. Dans un second temps, le typage après restriction avec l'enzyme *Xba* I (générant un nombre plus élevé de fragments donc plus discriminante) permet d'étudier la stabilité des souches. Si les pulsotypes sont identiques en *Spe* I mais différent en *Xba* I, cela signifie que les souches ont muté.

La présence dans le génôme de *BBS* de séquences d'insertion favorise l'établissement de recombinaisons génétiques. On ne peut exclure la possibilité d'une réversion de la virulence à la faveur d'un ou de plusieurs événements génétiques.

Conclusion :

L'innocuité pour l'homme du vaccin Intra-trac 1 reste à établir. Les connaissances sur *BBS* ont évolué depuis la mise au point de ce vaccin et le caractère zoonotique de cette bactérie a été formellement démontré. La souche Intra-trac 1 est certes atténuée mais possède les trois facteurs de virulence les plus importants. Les bases bactériologiques et biochimiques de l'atténuation de la virulence ne sont pas connues.

4. Persistance de *Bordetella bronchiseptica* chez les chiens infectés

Une persistance de *BBS* sur une durée supérieure à deux ans a été démontrée chez la patiente de 79 ans infectée par ses lapins. Il est possible que la bactérie persiste d'une façon comparable chez le chien mais cela n'a, pour l'instant, pas été démontré. Une telle persistance permettrait cependant d'expliquer les infections respiratoires récurrentes chez certains chiens. Les chiots s'infecteraient principalement dans les chenils d'élevage ou chez les grossistes, resteraient porteurs asymptomatiques de *BBS* et rechuteraient lors de stress (arrivée à l'animalerie, achat par le propriétaire). Le fait que les souches pathogènes collectées dans

Race	BBS	Type	jour du prélèvement	jour de la vente	semaines suivant la vente
41 Labrador			sain	sain	sain
42 Labrador			sain		
43 Shar pei	BBS II	sauvage	TC	TC	TC
44 Boxer	BBS I	vaccin	sain	sain	TC
45 Boxer	BBS I	vaccin ?	sain	sain	sain
46 Boxer	BBS I	vaccin ?	sain		
47 Golden retriever	BBS II	sauvage	TC	sain	sain
48 Bichon	BBS II	sauvage	sain	sain	sain
49 Aidi	BBS I	vaccin ?	sain	TC	TC
50 Malinois			sain		
51 Lhasa apso			sain		
52 WHWT	BBS II	sauvage ?	sain	sain	TC
53 Loulou			TC	sain	sain
54 Loulou	BBS II	sauvage ?	TC	sain	sain
55 Scottish terrier			sain		
57 Lhasa apso			TC	TC	TC
58 Shih tzu			TC		
59 Labrador	BBS II	sauvage	TC	sain	sain
60 Labrador	BBS II	sauvage	TC		
61 Golden retriever	BBS II	sauvage	TC		
62 Carlin			TC		
63 Bull terrier			sain	TC	TC + TC autre chien
64 Cocker amer.			sain	sain	TC
65 Cocker amer.			sain	sain	sain
66 Cocker spaniel			sain	sain	sain
67 Cocker spaniel			sain	sain	sain

GRUPE III 25/02/2000

GRUPE IV 09/03/2000

Tableau 13. Etat clinique des chiens après la vente (groupes III et IV)

cette étude soient toutes en phase II pourrait signifier que la bactérie était présente chez les chiots depuis une assez longue période.

Une enquête téléphonique a été menée auprès des acheteurs des chiens de cette étude, en leur demandant de préciser :

- l'état clinique du chien le jour de l'achat et les semaines suivantes,
- la contamination éventuelle d'un sujet en contact (chien, chat, autre animal ou membre de la famille).

Les résultats de l'enquête sont regroupés dans les tableaux 12 et 13.

Les chiens 3, 4 (*BBS+*), 43 (*BBS+*) et 57, atteints de TC le jour du prélèvement, présentaient encore des symptômes le jour de l'achat. La TC a rétrocedé en une semaine chez les chiens 3, 4 et 43. Le chien 57, atteint d'une forme chronique évoluant depuis quatre mois, a continué à tousser pendant deux semaines.

Les chiens 18, 19, 49 et 63 atteints de TC le jour de l'achat, ont guéri en une semaine.

Le chien de la maison a déclaré une TC quelques jours après l'arrivée du chiot 63.

Les chiens 34, 38, 44, 52 (*BBS+*) et 64, sains le jour du prélèvement et le jour de l'achat, ont déclaré une TC dans les jours suivant leur acquisition.

Le suivi sur un long terme par des prélèvements réguliers des chiens chez lesquels nous avons isolé *BBS* permettrait de préciser la persistance de la bactérie et d'étudier l'évolution de ses facteurs de virulence.

CONCLUSIONS

L'étude réalisée montre que :

- le prélèvement par écouvillonnage nasal permet d'isoler *BBS* chez le chien,
- une forte proportion de chiens dans ces quatre animaleries est contaminée par *BBS*,
- certains chiens sont porteurs de la souche vaccinale Intra-trac 1.

Un écouvillonnage nasal plutôt que pharyngé, une mise en culture rapide et l'utilisation d'un milieu spécifique augmentent considérablement la sensibilité du diagnostic. Dans cette étude, *BBS* a été isolée chez 52 % des chiens malades.

Cependant, même dans des conditions de prélèvement et d'isolement optimales, il est probable qu'un nombre important de chiens infectés par *BBS* échappe au diagnostic par culture.

Dans notre effectif, *BBS* a été isolée chez 10 % de chiens ne présentant aucun symptôme de TC au moment du prélèvement. Ces chiens pourraient être des porteurs sains. Compte tenu de la faible sensibilité du diagnostic par culture, le nombre de porteurs sains pourrait être plus élevé.

Le typage par ECP offre une bonne discrimination des isolats.

Cette technique nous a permis :

- de confirmer ou d'infirmer l'origine vaccinale de l'isolat,
- de regrouper les souches pathogènes dont les pulsotypes étaient identiques et de constituer des groupes épidémiques.

Dans la population étudiée, une forte proportion (30 %) de chiens vaccinés avec le vaccin Pneumodog ou le vaccin Intra-trac 1 présentait des symptômes de TC et *BBS* a été isolée chez la moitié de ces chiens. *BBS* a également été isolée chez des chiens apparemment sains vaccinés avec l'un ou l'autre vaccin. Il semble que l'immunité induite par les vaccins ne soit que partielle et qu'ils ne préviennent pas le portage de la bactérie.

La souche vaccinale a été isolée chez une forte proportion de chiens vaccinés récemment avec le vaccin Intra-trac 1 ainsi que chez des chiens non vaccinés vivant à leur contact. Le vaccin persiste dans les cavités nasales pendant au moins deux semaines et se répand par passage de chien à chien.

La souche vaccinale est en phase I et possède les trois facteurs de virulence les plus importants.

Les bases bactériologiques et biochimiques de l'atténuation de la virulence ainsi que la stabilité de la souche ne sont pas connues. La fluidité génomique de *BBS* pourrait entraîner une réversion de la virulence.

D'après ces données il n'est pas possible d'exclure une contamination humaine par une souche vaccinale atténuée. L'innocuité pour l'homme du vaccin Intra-trac 1 reste à établir.

Enfin, l'hypothèse d'une persistance de *BBS* sur de longues périodes chez le chien doit être explorée.

PERSPECTIVES

L'infection à *BBS* chez l'homme est une zoonose rare mais probablement sous diagnostiquée. La prévalence de cette maladie est vraisemblablement très supérieure à ce que laissent penser les quelques cas d'infection diagnostiqués.

Le nombre croissant d'individus immunodéprimés, l'absence de protection croisée des futurs vaccins coqueluche acellulaires, une modification de la pression de sélection par les antibiotiques pourraient contribuer à l'émergence de cette zoonose dans les années à venir.

Malgré les avancées réalisées, les connaissances sur cette bactérie sont encore fragmentaires. Les recherches en cours devraient permettre de caractériser d'autres facteurs de virulence et d'autres systèmes de régulation de cette virulence. Plusieurs arguments suggèrent une persistance intracellulaire de *BBS*. Cette hypothèse doit être confirmée *in vivo*.

La mise au point d'un vaccin induisant une immunité accrue semble nécessaire. La nature de ce vaccin (entier ou acellulaire) et sa voie d'administration (parentérale ou intranasale) restent à déterminer. Dans l'hypothèse d'un vaccin vivant, le caractère zoonotique de *BBS* devra être pris en compte.

Il est important de développer de nouveaux outils de diagnostic. Une PCR spécifique de *BBS*, adaptée à l'animal, permettrait un diagnostic plus rapide, spécifique et sensible que la culture. Elle serait notamment indiquée dans le dépistage des porteurs sains. La mise au point d'une sérologie utilisant des antigènes spécifiques de *BBS* trouverait son application principale en épidémiologie.

Enfin, il est essentiel de mettre en place des réseaux d'épidémiosurveillance avec des méthodes diagnostiques standardisées et un typage des souches. Ces réseaux devraient permettre de déterminer la prévalence de *BBS* dans les populations, animales et humaines, et de préciser les modalités de transmission de cette zoonose.

En effet, si l'importance des infections à *BBS* est établie chez le chien et le porc, elle est inconnue dans d'autres espèces réputées moins sensibles (chat, cheval, NAC) ainsi que dans la faune sauvage. Le typage permettrait de suivre la circulation et la variation des souches.

Dans la population humaine, certaines personnes, de par leur profession (vétérinaires, éleveurs, animaliers) ou du fait d'un statut immunologique particulier (très jeunes enfants, personnes âgées, individus immunodéprimés), sont probablement plus exposées que les autres. Les vétérinaires praticiens, sensibilisés au risque zoonotique, pourraient constituer un premier sujet d'étude épidémiologique de cette maladie.

La transmission de *BBS* de l'animal à l'homme n'a, pour l'instant, été démontrée que dans deux cas : une patiente infectée par son lapin et une autre patiente contaminée par son chien. Lors d'infection humaine à *BBS*, l'origine zoonotique devrait être systématiquement explorée par des prélèvements sur les animaux présents dans l'entourage du malade et la recherche d'une identité entre les isolats humains et animaux par le typage en ECP.

L'étude épidémiologique de cette zoonose requiert une étroite collaboration entre médecins et vétérinaires.

CONCLUSION

L'infection à *BBS* chez l'homme est une zoonose rare mais probablement sous diagnostiquée. La prévalence de cette maladie est vraisemblablement très supérieure à ce que laissent penser les quelques cas d'infection diagnostiqués.

Le nombre croissant d'individus immunodéprimés, l'absence de protection croisée des futurs vaccins coqueluche acellulaires, une modification de la pression de sélection par les antibiotiques pourraient contribuer à l'émergence de cette zoonose dans les années à venir.

Malgré les avancées réalisées, les connaissances sur cette bactérie sont encore fragmentaires. Les recherches en cours devraient permettre de caractériser d'autres facteurs de virulence et d'autres systèmes de régulation de cette virulence. Plusieurs arguments suggèrent une persistance intracellulaire de *BBS*. Cette hypothèse doit être confirmée *in vivo*.

La mise au point d'un vaccin induisant une immunité accrue semble nécessaire. La nature de ce vaccin (entier ou acellulaire) et sa voie d'administration (parentérale ou intranasale) restent à déterminer. Dans l'hypothèse d'un vaccin vivant, le caractère zoonotique de *BBS* devra être pris en compte.

Il est important de développer de nouveaux outils de diagnostic. Une PCR spécifique de *BBS*, adaptée à l'animal, permettrait un diagnostic plus rapide, spécifique et sensible que la culture. Elle serait notamment indiquée dans le dépistage des porteurs sains. La mise au point d'une serologie utilisant des antigènes spécifiques de *BBS* trouverait son application principale en épidémiologie.

Enfin, il est essentiel de mettre en place des réseaux d'épidémiologie avec des méthodes diagnostiques standardisées et un typage des souches. Ces réseaux devraient permettre de déterminer la prévalence de *BBS* dans les populations, animales et humaines, et de préciser les modalités de transmission de cette zoonose.

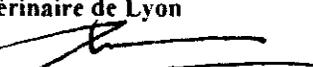
En effet, si l'importance des infections à *BBS* est établie chez le chien et le porc, elle est inconnue dans d'autres espèces réputées moins sensibles (chat, cheval, NAC) ainsi que dans la faune sauvage. Le typage permettrait de suivre la circulation et la variation des souches.

Dans la population humaine, certaines personnes, de par leur profession (vétérinaires, éleveurs, animaliers) ou du fait d'un statut immunologique particulier (très jeunes enfants, personnes âgées, individus immunodéprimés), sont probablement plus exposées que les autres. Les vétérinaires praticiens, sensibilisés au risque zoonotique, pourraient constituer un premier sujet d'étude épidémiologique de cette maladie.

La transmission de *BBS* de l'animal à l'homme n'a, pour l'instant, été démontrée que dans deux cas : une patiente infectée par son lapin et une autre patiente contaminée par son chien. Lors d'infection humaine à *BBS*, l'origine zoonotique devrait être systématiquement explorée par des prélèvements sur les animaux présents dans l'entourage du malade et la recherche d'une identité entre les isolats humains et animaux par le typage en ECP.

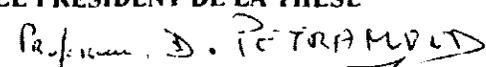
L'étude épidémiologique de cette zoonose requiert une étroite collaboration entre médecins et vétérinaires.

LE PROFESSEUR RESPONSABLE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon


LUC CHABANNE
Docteur Vétérinaire

VU : LE DIRECTEUR
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

LE PRESIDENT DE LA THESE


Professeur D. PETRAMBUS

PROFESSEUR J.-F. CHARY

Vu et permis d'imprimer

LYON, le

Le Président de l'Université
Président du Comité de Coordination
Des Etudes Médicales. DECHAVANNE Marc

BIBLIOGRAPHIE

- Agiato L. and Dyer D.W.** 1992. Siderophore production and membrane alteration by *Bordetella pertussis* in response to iron starvation. *Infect. Immun.* 60 : 117-123.
- Altschul, S.F.** 1989. Evolutionary trees for the genus *Bordetella*. *J. Bacteriol.* 171 : 1211-1213.
- Arico B., Gross R., Smida J. and Rappuoli R.** 1987. Evolutionary relationships in the genus *Bordetella*. *Mol. Microbiol.* 1 : 3001-3008.
- Arico B. and Rappuoli R.** 1987. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J. Bacteriol.* 169 : 2847-2853.
- Arico B., Nuti S., Scarlato V. and Rappuoli R.** 1993. Adhesion of *Bordetella pertussis* to eucaryotic cells requires a time-dependant export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 9204-9208.
- Bannan J., Moran J., Mac Innes J., Soltes G. and Friedman R.** 1993. Cloning and characterization of *btr*, a *Bordetella pertussis* gene encoding an FNR-like transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* 175 : 7228-7235.
- Baron S.** Evaluation épidémiologique de la coqueluche en Europe en 1995. 1995. *Méd. Mal. Infect.* ; 25 Spécial : 1263-1267.
- Bayly W. M., Redd M., Foreman J.H., Traub J.L. and Mc Murphy R.M.** Equine Bronchopneumonia due to *Bordetella bronchiseptica*. 1982. *Eq. Pract.* 4 : 25-32.
- Bemis D.A., Greisen H.A. and Appel M.J.G.** 1977. Bacteriological variation among *Bordetella bronchiseptica* isolated from dogs and other species. *J. Clin. Microbiol.* 5 : 471-480.
- Betsou F., Sebo P. and Guiso N.** 1995b. The C-terminal domain is essential for protective activity of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 63 ; 9 : 3309-3315.
- Betsou F., Sismeiro O., Danchin A. and Guiso N.** 1995a. Cloning and sequence of the *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase-hemolysin-encoding gene : comparison with the *Bordetella pertussis* gene. *Gene.* 162 ; 1 : 165-166.
- Bey R.F., Shade F.J., Goodnow R.A. and Russel C.J.** 1981. Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *Bordetella bronchiseptica* : correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis. *Am. J. Vet. Res.* 42 : 1130-1132.
- Binns S.H., Dawson S., Speakman A.J., Cuevas L.E., Gaskell C.J., Hart C.A., Morgan K.L. and Gaskell R.M.** 1999. Prévalence and risk factors for feline *Bordetella bronchiseptica* infection. *Veterinary Record* 144 : 575-580.
- Boschwitz J.S., Batanghari J. W., Kedem H. and D.A. Relman.** 1997. *Bordetella pertussis* infection of human monocytes inhibits antigen-dependant CD4 cell prolifération. *J. Infect. Dis.* 176 : 678-686.
- Boursaux-Eude C. and Guiso N.** 2000. Polymorphism of the Repeated Regions of Pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 68 : 4815-4817.
- Brooksaler F. and Nelson J.D.** 1967. Pertussis a reappraisal and report of 190 confirmed cases. *Am. J. Dis. Child.* 114 : 389-396.
- Brown J.H.** 1926. *Bacillus bronchisepticus* infection in a child with symptoms of Pertussis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 38 : 147-153.
- Buggy B.P., Brosius F.C., Bogin R.M., Koller C.A. and Schaberg D.R.** 1987. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *South. Med. J.* 80 : 1187-1189.

- Burns E.H., Norman J.M., Hatcher M.D. and Bemis D.A.** 1993. Fimbriae and determination of host species specificity of *Bordetella bronchiseptica*. J. Clin. Microbiol. 31 : 1838-1844.
- Byrd L.H., Anama L., Gutkin M and Chmel H.** 1981. *Bordetella bronchiseptica* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. J. Clin. Microbiol. 14 : 232-233.
- Canfield P.J., Oxenford C.J. and Lomas G.R.** 1986. A disease outbreak involving pneumonia in captive koalas. Aust. Vet J. 63 : 312-313.
- Chang S. M.** 1950. Pertussis due to *Brucella bronchiseptica*. Case report. Paediatrics 6 : 227-228.
- Chang K.C., Zakheim R.M., Cho C.T. and Montgomery J.C.** 1975. Posttraumatic purulent meningitis due to *Bordetella bronchiseptica*. J. Pediatr. 86 : 639-640.
- Chanter N., Magyar T. and Rutter J.M.** 1989. Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. Res. Vet. Sci. 47 : 48.
- Chauncey J.B. and Schaberg D.R.** 1990. Interstitial pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* in a heart transplant patient. Transplantation 49 : 817-819.
- Chaby R. and Caroff M.** 1988. Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis* endotoxin. In : Pathogenesis and Immunity in Pertussis. Warlaw A. and Parton R., (EDS) J. Wiley. Chichester. 247-271.
- Choe M. and Reznikoff W.S.** 1991. Anaerobically expressed *E. coli* genes identified by operon fusion techniques. J. Bacteriol. 173 : 6139-6146.
- Chung W.B., Collins M.T. and Backstrom L.R.** 1990. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to swine nasal ciliated epithelial cells *in vitro*. APMIS. 98 : 453-461.
- Cookson, B.T., Vandamme, P., Carlson, L.C., Larson, A.M., Sheffield, J.V.L., Kersters, K. and Spach, D.H.** 1994. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, « *B. hinzii* ». J. Clin. Microbiol. 32 : 2569-2571.
- Coutts, A.J., Dawson, S., Binns, S., Hart, C.A., Gaskell, C.J. and Gaskell, R.M.** 1996. Studies on natural transmission of *Bordetella bronchiseptica* in cats. Vet. Microbiol., 48(1) : 19-27.
- Corbiere-Priot L.** 1996. Sensibilité de *Bordetella bronchiseptica* aux antibiotiques (Etude de 80 souches). Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de la Méditerranée. Aix-Marseille II.
- Coutts A.J., Dawson S., Binns S., Hart C.A., Gaskell C.J. and Gaskell R.M.** 1996. Studies on natural transmission of *Bordetella bronchiseptica* in Cats Veterinary Microbiology 48 : 19-27.
- Dale A. J. D. and Geraci J.E.** 1961. Mixed cardiac valvular infections : report of case and review of literature. Staff Meet. Mayo clinic. 36 : 288-293.
- Dawson S., Jones D., McCracken C.M., Gaskell R.M., Hart C.A. and Gaskell C.J.** 2000. *Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs. Veterinary Record. 146 : 46-48.
- De Baillou G.** Epidemiorum et ephemeridium, libri duo. Parisiis 1640. In H.W. Ocklitz (ed), « Der Keuchhusten », Ch.2. Gustav Fischer, Jena, République Démocratique Allemande.
- Deeb B.J., Digiacomo R.F., Bernard B.L. and Silbernagel S.M.** 1990. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. J. Clin. Microbiol. 28 : 70-75.
- Elliot H.** 1991. *Bordetella bronchiseptica* in a closed cat colony. Veterinary Record 129 : 474-475.

- Endoh M., Amitani M. and Nakase Y.** 1986. Effect of purified heat-labile toxin of *Bordetella bronchiseptica* on the peripheral blood vessels in guinea pigs or suckling mice. *Microbiol. Immunol.* 30 : 1327-1330.
- Farrington D.O. and Switzer W.P.** 1977. Evaluation of nasal culturing procedures for the control of atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170 : 34.
- Fass R.J., Barnishan J., Solomon M.C. and Ayers L.W.** 1996. In vitro activities of quinolones, beta-lactams, tobramycin and trimethoprim-sulfamethoxazole against nonfermentative Gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 40 : 1412-1418.
- Farzaneh S.** 1993. Sensibilité de *Bordetella bronchiseptica* aux bêta-lactamines et déterminismes. Mémoire présenté pour l'obtention de DEA de microbiologie. Service de Microbiologie Hôpital Saint-Louis.
- Ferry N.S.** 1910. A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. *Am. Vet. Rev.* 37 : 499-504.
- Ferry N.S.** 1912. *Bacillus bronchisepticus* : The cause of distemper in dogs and a similar disease in others animals. *Vet.* 68 : 376-391.
- Ferry N.S.** 1917. Canine distemper. *Proc. Wis. Vet. Med. Assoc.* : 80-88.
- Ferry N.S. and Noble A.** 1918. Studies relative to the apparent close relationship between *B. pertussis* and *B. bronchiseptica*. Cultural agglutination and absorption reactions. *J. Bacteriol.* 3 : 193-208.
- Filion R., Chantier S., Vrancken E.R. et Bernier G.** 1967. Infection respiratoire du dindonneau causée par un microbe apparenté à *Bordetella bronchiseptica*. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 31 : 129-134.
- Fisk S.K. and Soave O.A.** 1973. *Bordetella bronchiseptica* in laboratory cats from central California. *Laboratory Animal Science* 73 ; 23 : 33-5.
- Flack T.A. and Goldman W.E.** 1999. Signaling and cellular specificity of airway nitric oxide production in *pertussis*. *Cell. Microbiol.* 1 : 51-60.
- Gardner P., Griffen W.B., Schwartz M.N. and Kunz L.J.** 1970. Non fermentative Gram negative bacilli of nosocomial interest. *Am. J. Med.* 48 : 735-749.
- Ghosh H.K. and Tranter J.** 1979. *Bordetella bronchicanis (bronchiseptica)* infection in man : review and a case report. *J. Clin. Pathol.* 32 : 546-548.
- Giles C.J. and Smith I.M.** 1983. Vaccination of pigs with *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Bull.* 53 : 327.
- Goldman S., Hansi E. and Fish F.** 1984. Spontaneous phase variation in *Bordetella pertussis* in a multistep non-random process. *EMBO J.* 3 : 1353-1356.
- Goodnow, R.A.** 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* 44 : 722-738.
- Gordon V., Young W.W., Lechler S.M., Gray M.C., Leppla S.H. and Hewlett E.L.** 1989. Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. *J. Biol. Chem.* 264 : 14792-14796.
- Graham A.C. and G.T. Abrizzo.** 1982. Occurrence and characterisation of plasmids in field isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Am. J. Vet. Res.* 43 : 1852-1855.
- Gross R., Arico B. and Rappuoli R.** 1989a. Genetics of pertussis toxin. *Mol. Microbiol.* 3 : 119-124.
- Gueirard P. and Guiso N.** 1993. Virulence of *Bordetella bronchiseptica* : Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin. *Infection and Immunity*, Oct. 1993 : 4072-4078.
- Gueirard P., Weber C., Le Coustumier A. and Guiso. N.** 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals : persistence of bacteria in host. *J. Clin. Microbiol.* 33 : 2002-2006.

- Gueirard P., Le Coustumier A. and Guiso N.** 1998. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect. Immun.* 66(4) : 1718-1725.
- Guiso N., Rocancourt M., Szatanik M. and Alonso J.M.** 1989. *Bordetella* adenylate cyclase is a virulence associated factor and an immunoprotective antigen. *Microbiol. Pathogen.* 7 : 373-380.
- Guiso N., Szatanik M. and Rocancourt M.** 1990. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase : a protective antigen against lethality and bacterial colonization in murine respiratory and intracerebral models. In proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis. Manclarck, CR (Eds). DHHS publication no. (FDA) 90-1164. Department of Health and services, US. Public health service, Bethesda, Md. 207-211.
- Guiso N., Szatanik M. and Rocancourt M.** 1991. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. *Microbiol. Pathogen.* 11 : 423-431.
- Guiso N., Grimprel E. et Bégué P.** 1994. Surveillance de la coqueluche en France : retombées prophylactiques. *Immunologie Médicale.* 10 : 2-10.
- Guitton A.** 1987. Prophylaxie médicale de la toux de chenil. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- Guzman C., Rohde M., Bock M. and Timmis K.** 1994a. Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* 62 : 5528-5537.
- Guzman C., Rohde M., Bock M. and Timmis K.** 1994b. Mechanisms involved in uptake of *Bordetella bronchiseptica* by mouse dendritic cells. *Inf. and Immun.* 62 : 5538-5544.
- Harris D.L., Ross R.F. and Switzer W.P.** 1969. Incidence of certain micro-organisms in nasal cavities of swine in Iowa. *Am. J. Vet. Res.* 30 : 1621.
- Hinz K.H., Glunder G. and Luders H.** 1978. Acute respiratory disease in turkey poults caused by *Bordetella bronchiseptica*-like bacteria. *Vet. Rec.* 103 : 262-263.
- Horiguchi Y., Nakai T. and Kume K.** 1991. Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin suppresses *in vivo* antibody responses in mice. *Fems Microbiol. Letters.* 90 : 229-234.
- Hozbor D., Fouque F. and Guiso N.** 1999. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 50 : 1-9.
- Ishikawa H., Isayama Y. and Ohmae K.** 1988. Decrease in antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* caused by antigenic modulation and phase variation. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 32 : 1891-1892.
- Jacobs A.A.C, Chalmers W.S.K., Pasman J., Van Vugt F., and Guenene L.H.** 1993. Feline bordetellosis : challenge and vaccine studies. *Veterinary Record* 133 : 260-3.
- Jenkins E.M., Anthony V., Vance R.T., Cleveland J. and Gbadamosi S. G.** 1977. Prevalence of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine of south-eastern Alabama. *Am. J. Vet. Res.* 38 : 2071.
- Johnson R. and Sneath P.H.A.** 1973. Taxonomy of *Bordetella* and related organisms of the families *Achromobacteraceae*, *brucellaceae* and *Neisseriaceae*. *Int. J. Ssyst. Bacteriol.* 23 : 381-404.
- Jones M.** 1950. Subacute bacterial endocarditis of nonstreptococcic etiology, a review of the literature of the thirteen-year period 1936-1948 inclusive. *Am. Heart. J.* 40 : 106-116.
- Katzenstein D.A., Cjofalo L. and Jordan C.M.** 1984. *Bordetella bronchiseptica* bacteremia. *West. J. Med.* 140 : 96-98.
- Kerstens K., Hintz K.H., Hertle A., Seegers P., Lievens A., Siegmann O. and De Ley J.** 1984. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int. J. Syst Bacteriol.* 34 : 56-70.

- Khelef N., Zychlinsky A. and Guiso N.** 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages : Role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 61 : 4064-4071.
- Khelef N., Bachelet C.M., Vargaftig B.B. and Guiso N.** 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect. Immun.* 62 : 2893-2900.
- Kimura A., Mountzouros K., Relman D., Falkow S., and Cowell J.** 1990. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin : Evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect. Immun.* 58 : 7-16.
- Klein H.J., Hall W.C. and Pouch W.J.** 1987. Characterization of an outbreak of *Bordetella bronchiseptica* in a group of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Laboratory Animal Science.* 37 : 524.
- Kloos W., Mohapatra N., Dobrogosz W.J., Ezzel J.W. and Manclark C.R.** 1981. Deoxyribonucleotide sequence relationships among *Bordetella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31 : 173-176.
- Kobish M. and Novotny P.** 1990. Identification of a 68-kiloDalton outer-membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect. Immun.* 58 : 352-357.
- Kontor E.J., Wegrzyn R.J. and Goodnow R.A.** 1981. Canine Infectious Tracheobronchitis : effects of an intranasal live canine Parainfluenza-*Bordetella bronchiseptica* vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (Kennel cough). *Am. J. Vet. Res.* 42 : 1694-1698.
- Krepler P. and Flamm H.** 1958. *Bordetella bronchiseptica* als Erreger menschlicher Erkrankungen. *Wien Klin. Wochenschr.* 70 : 641-644.
- Kristensen K.H. and Lautrop H.** 1962. En familieepidemi forarsaget af kighostebakterien *Bordetella bronchiseptica*. *Ugeskr., Laeg.* 124 : 303-308.
- Kurzynski T.A., Boehm D.M., Rott-Petri J.A., Schell R.F. and Allison P.E.** 1988. Antimicrobial susceptibilities of *Bordetella* species isolated in a multicenter pertussis surveillance project. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 32 : 137-140.
- Ladant D., Brezin C., Crenon I., Alonso J.M. and Guiso N.** 1987 *Bordetella pertussis* adenylate cyclase : purification, characterisation and radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 261 : 16264-16269.
- Le Coustumier A., Gueirard P. et Guiso N.** 1995. Infections humaines à *Bordetella bronchiseptica*. *Médecine et maladies infectieuses. Spécial,* 25 : 1243-1247.
- Lee S.W., Way A.W. and Osen E.G.** 1986. Purification and subunit heterogeneity of pili of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 51 : 586-593.
- Leininger E., Roberts M., Kenimer J.G., Charles I.G., Fairweather N., Novotny P. and Brennan M.J.** 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 345-349.
- Lejeune B., Chastel C., Garre M., Boles J.M. and Alonso J.M.** 1988. Infection humaine à *Bordetella bronchiseptica*. *Med. Mal. Infect.* 11 : 852.
- Letcher J., Weisenberg E. and Jonas A.** 1993. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a koala. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 6 : 985-986.
- Mac Ardle H.C., Dawson S., Coutts A.J., Bennett M., Hart C.A., Ryvar R. and Gaskell R.M.** 1994. Seroprevalence and isolation rate of *Bordetella bronchiseptica* in cats in the UK. *Veterinary Record* 135 : 506.
- Mac Candlish I.A.P. and Thompson H.** 1978a. Vaccination against canine bordetellosis using a heat-killed bacterial vaccine. *Research in Veterinary Science.* 25 : 45-50.
- Mac Candlish I.A.P. and Thompson H.** 1978b. Vaccination against canine bordetellosis using an aluminium hydroxide adjuvant vaccine. *Research in Veterinary Science.* 25 : 51-57.

- Mac Gowan J.P.** 1911. Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats in which the animals affected presented the symptoms of the disease called « distemper ». *J. Pathol. Bacteriol.* 15 : 372-426.
- Mac Kenzie R.a., Wood A.D. and Blackall P.J.** 1979. Pneumonia Associated with *Bordetella bronchiseptica* in captive koalas. *Aust. Vet.* 55 : 427-430.
- Magyar T., Chanter N., Lax A. J., Rutter J.M. and Hall G.A.** 1988. The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs cause by *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Microbiol.* 18 : 135.
- Mahon B.P. and Mills K.H.G.** 1999. Interferon- gamma mediated immune effector mechanisms against *Bordetella pertussis*. *Immunol. Lett.* 68 : 213-217.
- Martin R., Riley P.S., Hollis D.G., Weaver R.E. and Krichevsky M.I.** 1981. Characterization of some groups of gram-negative nonfermentative bacteria by the carbon source alkalization technique. *J. Clin. Microbiol.* 14 : 39-47.
- Meis J.F., Van Griethuijsen A.J. and Muytjens H.L.** 1990. *Bordetella bronchiseptica* bronchitis in an immunodeficient patient (letter). *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5 : 366-367.
- Melton A. and Weiss A.A.** 1993. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 61 : 807-815.
- Merckel T.J., Barros C. and Stibitz S.** 1998. Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 180 : 1682-1690.
- Mitscherlich E. and Marth E.H.** 1984. Bacteria and Rickettsiae important in human and animal health. (Eds). Verlag, S. Microbiol. Survival in the environment. Berlin. 45-47.
- Monack D., Rappuoli B. and Falkow S.** 1989. Phase variants of *Bordetella bronchiseptica* arise by spontaneous deletions in the *vir* locus. *Mol. Microbiol.* 3 : 1719-1728.
- Moreno-Lopez M.** 1952. El genero *Bordetella*. *Microbiol. Esp.* 5 : 177-181.
- Mortensen J.E., Brumbach A. and Shryock T.R.** 1989. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 33 : 771-772.
- Musser J.M., Hewlett E.L., Pepler M.S. and Selander R.K.** 1986. Genetic diversity and relation ships in populations of *Bordetella spp.* *Journal of Bacteriology* 166 (1) : 230-237.
- Nakase Y.** 1957a. Studies on *Hemophilus bronchisepticus* I. The antigenic structure of *H. bronchisepticus* from guinea pig. *Kitasato Arch. Of Exp. Med.* 30 : 57-72.
- Nakase Y.** 1957b. Studies on *Hemophilus bronchisepticus* II. Phase variation of *H. bronchisepticus*. *Kitasato Arch. Of Exp. Med.* 30 : 17-21.
- Nakase Y.** 1957c. Studies on *Hemophilus bronchisepticus* III. Differences of biological properties between phase I and phase III of *H. bronchisepticus*. *Kitasato Arch. Of Exp. Med.* 30 : 23-28.
- Nakase Y.** 1957d. Studies on *Hemophilus bronchisepticus* IV. Serological relation of *H. bronchisepticus* from guinea pig, dog and human. *Kitasato Arch. Of Exp. Med.* 30 : 29-38.
- Papasian C.J., Downs N.W., Talley romberger R.L. and Hodges G.R.** 1987. *Bordetella bronchiseptica* bronchitis. *J. Clin. Microbiol.* 5 : 575-577.
- Parton R.** 1986. Effect of anti-inflammatory agents on the haemorrhagic response of mouse skin to *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. *J. Med. Microbiol.* 21 : 265-270.
- Pittman M.** 1984. Genus *Bordetella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg N.R. and Holt J.C. (Eds). Vol. 1. Williams and Wilkins Baltimore : 388-393.
- Pijpers A., Van Klingereren B., Schoevers E.J., Verheijden J.H.M. and Van Miert A.S.** 1989. In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory tract pathogens. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 12 : 267-276.
- Philippon A., Arlet G., Chebbi F. et Guiso N.** 1991. Sensibilité aux antibiotiques de *Bordetella bronchiseptica* : Différenciation phénotypique avec *Alcaligenes faecalis* et *Alcaligenes xylosoxydans*. *Med. Mal. Infect.*, 21 : 627-632.

- Plotkin B.J. and Bemis D.A.** 1984. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to hamster lung fibroblasts. *Infect. Immun.* 46 : 697-702.
- Porter J.F., Parton R. and Wardlaw A.C.** 1991. Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl. and Envir. Microbiol.* 57 : 1202-1206.
- Porter J.F. and Wardlaw A.C.** 1993. Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *Fems Microbiol. Letters.* 110 : 33-36.
- Poyade-Alvarado A. et Marcoux M.** 1993. Arthrite septique et ostéomyélite d'origine hématogène chez le poulain : 39 cas. (1985 – 1989). 1993. *Prat. Vet. Eq.* 25, 4 : 275-280.
- Rappuoli R.** 1994. Pathogenicity mechanisms of *Bordetella* in : Bacterial pathogenesis of plants and animals molecular and cellular mechanisms. *JL Dangi ad. Current topics in Microbiol. Immunol.* 12 : 319-337.
- Rhea L.J.** 1915. The comparative pathology of the tracheal and bronchial lesions produced in man by *Bacillus pertussis* and those produced in dogs by *Bacillus bronchisepticus*. *J. Med Res.* 32 : 471-474.
- Richter G.W. and Kress Y.** 1967. Electron microscopy of a strain of *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 94 : 1216-1224.
- Ross R.F., Switzer W.P. and Mare C.J.** 1963. Incidence of certain micro-organisms in Iowa swine. *Vet. Med.* 58 : 563.
- Sakamoto H., Bellalou J., Sebo P. and Ladant D.** 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J. Biol. Chem.* 267 : 13598-13602.
- Savelkoul P. H. M.** 1992. Adhesion factors of *Bordetella*. Proefschrift. Rijksuniversiteit. Ke Utrecht. Nederlands.
- Schipper H., Krohne G.F. and Gross R.** 1994. Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 62 : 3008-3011.
- Schoichi K.** 1927. Bacteriological studies on distemper. *Vet. J.* 80 : 327.
- Shade F.J. and Goodnow R.A.** 1979. Intranasal immunisation of dogs against *Bordetella bronchiseptica*-induced tracheobronchitis (Kennel Cough) with modified live-*Bordetella bronchiseptica* vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 40 : 1241-1243.
- Shimizu M., Kuninori K., Inoue M. and S. Mitsuhashi.** 1981. Drug resistance and R plasmids in *B. bronchiseptica* isolates from pigs. *Microbiol. Immunol.* 25 : 773-786.
- Smith I.M. and Baskerville A.J.** 1979. A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs. *Research in Veterinary Science.* 27 : 187-192.
- Smith I.M., Giles C.J. and Baskerville A.J.** 1982. The immunisation of pigs against experimental infection with *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Rec.* 110 : 488.
- Snell J.J.S.** 1973. The distribution and identification of non-fermenting bacteria. *Public health Lab. Serv., Monogr. Ser. N°4* : 1-45.
- Speakman A.J., Binns S.H., Osborn A.M., Corkill J.E., Kariuki S., Saunders J.R., Dawson S., Gaskell R.M. and Hart C.A.** 1997. Characterisation of antibiotic resistance plasmids from *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 40, 811-816.
- Speakman A.J., Binns S.H., Dawson S., Hart C.A. and Gaskell R.M.** 1997. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from cats and a comparison of the agar dilution and E-test methods. *Veterinary Microbiology* 54 : 63-72.
- Stibitz S. and Yang M.S.** 1991. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the *vir* locus of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 173 : 4288-4296.

- Stibitz S. and Yang M.S.** 1999. Genomic plasticity in natural populations of *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol. 181 : 5512-5515.
- Stoll D.B., Murphey S.A. and Ballas S.K.** *Bordetella bronchiseptica* infection in stage IV Hodgkin's disease. Postgrad. Med. J. 57 : 723-724.
- Switzer W.P., Maré J. and Hubbard E.D.** 1966. Incidence of *Bordetella bronchiseptica* in Wildlife and Man in Iowa. Am. J. Vet. Res. 27, 119 : 1134-1136.
- Terakato N., Araki S, Mori Y., Sekizaki T. and Hashimoto K.** 1981. Non-conjugative R Plasmid with five drugs resistance from *Bordetella bronchiseptica* of pig origin. Jpn. J. Microbiol. 18 : 45-48.
- Thompson H., McCandlish I.A.P. and Wright N.G.** 1976. Experimental respiratory disease in dogs due to *Bordetella bronchiseptica*. Res. Vet. Sci. 20 :16-23, 1976.
- Uhl M.A. and Miller J.F.** 1996. Integration of multiple mains in a two -component sensor protein : The *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. EMBO J. 15(5) : 1028-1036.
- Vaissaire, J., Remond, M. et Manno, M.** 1989. Avortement et mortinatalité chez la chienne dus à *Pasteurella multocida* et à *Bordetella bronchiseptica*. Bull. Soc. Vét. Prat. De France.T. 73, n° 2, p. 83.
- Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, de Vos P, Falsen E, Kersters K and KH Hinz.** 1996. *Bordetella trematum* sp. Nov. Isolated from wounds and ear infections in humans and reassessment of *Alcaligenes denitrificans*. Ruger and Tan 1983. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 : 849-858.
- Vandevenne S., Caudron I., Serteyn D. and Mainil J.G.** 1995. Infection respiratoire équine à *Bordetella bronchiseptica*. Ann. Med. Vet. 139 : 349-352.
- Weiss A., Hewlett E.L., Myers G.A. and Falkow S.** 1984. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. J. Infect. Dis. 150 : 219-222.
- Weber C.** 1997. Application de l'électrophorèse en champ pulsé à l'étude du polymorphisme génomique des bordetelles. Mémoire pour le diplôme d'ingénieur CNAM en biologie en vue des applications. 29-35.
- Welsh R.D.**1996. *Bordetella bronchiseptica* infections in Cats. J Am Anim Hosp Assoc 32 : 153-8.
- Weyant R.S., Hollis D.G., Weaver R.E., Fadl M., Amin M., Steigerwalt A.G., O'Connor S.P., Whitney A.M., Daneshvar M.I., Moss C.W. and Brenner D.J.** 1995. *Bordetella holmessi* sp. nov., a new gram negative species associated with septicemia. J. Clin. Microbiol. 33: 1-7.
- Willoughby K., Dawson S., Jones R.C., Symons M., Daykin J., Payne-Johnson C., Gaskell R.M., Bennet M. and Gaskell C.J.** 1991. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from kittens with pneumonia in a breeding cattery. *Veterinary Record* 1991 ; 129 : 407-408.
- Wilson R., Read R., Thomas M., Rutman A., Harrison K., Lund V., Cookson B., Goldman W., Lambert H and Cole P.** 1991. Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium *in vivo* and *in vitro*. Infect. Immun. 59 : 337-345.
- Winsser J.** 1960. A study of *Bordetella bronchiseptica*. Proc. Anim. Care Panel. 11 : 87-104.
- Wong G.A, Peirce T.H., Goldstein E. and Hoepflich PD.,** 1975. Pénétration of antimicrobial agents into bronchial secretions. Am. J. Med., 59 : 219-223.
- Woolfrey B.F. and Moody J.A.** 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. Clin. Microbiol. Rev. 4 : 243-255.
- Wright N.G., Thompson H., Taylor D. and Cornwell H.J.C.** 1973. *Bordetella bronchiseptica* : a re-assessment of its role in canine respiratory disease. The Veterinary Record. November 3rd. 486-487.

- Yuk M.H., Harvill E.T. and Miller J.F.** 1998. The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella pertussis*. *Gene*. 209 : 51-58.
- Zong M.L., Cowell J.L., Brennan M.J., Burn D.L. and Manclareck C.R.** 1988. Agglutinating monoclonal antibodies that specifically recognize LPS of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* : 699-702.
- Zeligs B.J., Zeligs J.D. and Bellanti J.A.** 1986. Functional and ultrastructural changes in alveolar macrophages from rabbits colonized with *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 53 : 702-706.

SARIN, Christian

BORDETELLA BRONCHISEPTICA, UNE ZOONOSE EMERGENTE ?

Thèse Vétérinaire, Lyon 2001

RESUME :

Bordetella bronchiseptica est un pathogène fréquent du tractus respiratoire des mammifères, dont la caractéristique majeure, longtemps suspecte, a été démontrée en 1995. Le nombre de cas humains diagnostiqués semble en augmentation. Après une description des caractères bactériologiques et des symptômes animaux et humains, les pays les plus susceptibles d'émergence de cette zoonose sont envisagés. Une enquête est menée sur une population de chiens de garde autochtènes, notamment l'étude des poux et analyses de l'immunité acquise par les vacines. *Bordetella bronchiseptica* est isolée chez la moitié des chiens atteints de toux de chien. Des chiens infectés sont trouvés chez tous les élevés et porteurs de la bactérie. La souche vacinale est isolée chez des chiens vaccinés récemment avec un vaccin vivant atténué.

MOIS CLES :

- BORDETELLA BRONCHISEPTICA
- ZOONOSE

JURY :

Président : Professeur d'Anatomie P. F. AMORO

1^{er} Assesseur : Maître de Conférences C. CHABANET

2nd Assesseur : Professeur Jean-Luc CALVO

DATE DE SOULEVANCE : 11/05/2001

ADRESSE DE L'AUTEUR :

1, rue du Schnecken
67440 Hengwiller