

**CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DE LA
COQUELUCHE ET AUTRES BORDETELLOSES**



**RAPPORT ANNUEL
D'ACTIVITE 2023**

Année d'exercice 2022

CNR Coqueluche et autres bordetelloses

Responsable : Sylvain BRISSE

Responsables adjointes : Carla RODRIGUES et Julie TOUBIANA

Unité de Recherche Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes

Institut Pasteur

Le CNR remercie le réseau de correspondants microbiologistes et cliniciens, et en particulier les membres du réseau RENACOQ, le Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des hôpitaux, et les LABM Cerballiance et Eurofins-Biomnis pour l'envoi des échantillons, souches, résultats de tests moléculaires et informations associées, contribuant ainsi à la surveillance de la coqueluche et autres bordetelloses en France.

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit des pages publiées dans le présent rapport, faite sans l'autorisation écrite du CNR, est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées, tout en faisant clairement référence à ce présent rapport (C. Rodrigues, V. Bouchez, J. Toubiana & S. Brisse. 2023. Rapport annuel du Centre national de Référence de la Coqueluche et autre bordetelloses – Institut Pasteur, Paris, France). Les données issues des tableaux et figures présentées dans ce rapport ne doivent pas être publiées sans l'accord explicite du CNR.

RESUME ANALYTIQUE

FAITS MARQUANTS

La coqueluche reste un enjeu majeur de santé publique en France et dans le monde. Le rôle principal du Centre national de référence pour la Coqueluche et autres bordetelloses (CNRCOQ) est de contribuer au volet microbiologique de la surveillance de cette infection en France.

En 2022, le nombre d'échantillons reçus par le CNR est de 100, mais est particulièrement faible en ce qui concerne *Bordetella pertussis* (*Bp*). En plus d'une fin de cycle épidémique, cette faible circulation du principal agent de la coqueluche est possiblement aussi liée aux effets du contexte sanitaire exceptionnel provoqué par la pandémie de COVID-19. En 2022, seulement **deux** isolats cliniques de *Bp* ont été reçus. En revanche, les printemps et début d'été de 2022, ont été marqués par **l'alerte de la réémergence de *B. parapertussis* (*Bpp*)**, le second agent de la coqueluche, généralement associé à des infections moins graves. Plusieurs cas groupés ont été recensés dans plusieurs régions de France métropolitaine en collectivité, et nous avons collaboré avec Santé publique France (SpF) et les **agences régionales de santé (ARS)** concernées pour conduire les investigations. Contrairement à ce qui était observé depuis 2007, où tous les *Bpp* n'exprimaient pas la pertactine (PRN-), **72% des isolats de 2022 se sont révélés PRN+** et, au niveau génomique, ils semblent appartenir à des **lignées diverses et différentes de la lignée qui circulait majoritairement avant 2020**.

Sur le **conseil**, en plus des avis aux cliniciens ou microbiologistes, le CNR a été actif auprès des autorités (participation au groupe de travail du HCSP sur la vaccination contre la coqueluche chez la femme enceinte et à l'avis relatif à la conduite à tenir autour d'un ou plusieurs cas de coqueluche). De plus, des projets sur la vaccinologie et l'épidémiologie de la coqueluche et de *Bp* ont été terminés avec succès, comme par exemple, **l'impact du changement de calendrier vaccinal en 2013** (Lancet Inf Diseases), la compilation d'une **librairie génomique de *Bordetella*** (Nat Comms) et **l'impact des vaccins acellulaires sur l'évolution des différentes souches de *Bp*** (Science Transl Med).

Le CNR continue à participer à la surveillance des cas et des éventuelles modifications épidémiologiques liées aux changements de stratégie vaccinale, comme celle récente concernant la vaccination des femmes enceintes ; le suivi de la sensibilité aux antibiotiques (notamment la dissémination sur le territoire, des souches résistantes aux macrolides), et l'expression d'antigènes vacinaux (en particulier, fimbriae et pertactine).

EXECUTIVE SUMMARY

HIGHLIGHTS

Pertussis remains a major public health issue in France and throughout the world. The main role of the National Reference Centre for whooping cough and other *Bordetella* infections (CNRCOQ) is to contribute to the microbiological surveillance of this infection in France.

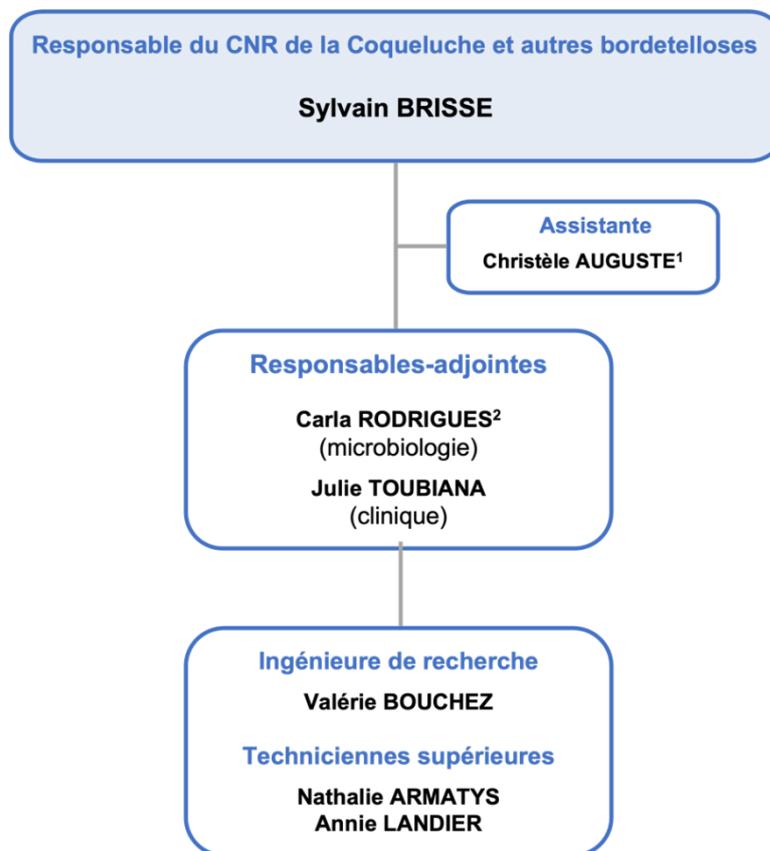
In 2022, the number of samples received by the CNR totaled 100, but was **particularly low for *Bordetella pertussis* (*Bp*)**. In addition to the end of the epidemic cycle, this low circulation of the main pertussis agent may also be linked to the effects of the exceptional health context caused by the COVID-19 pandemic. In 2022, only two clinical isolates of *Bp* were received. On the other hand, the **spring and early summer of 2022 were marked by the re-emergence of *B. parapertussis* (*Bpp*)**, the second pertussis agent, generally associated with less severe infections. Several clusters of cases were reported in several regions of mainland France, and we collaborated with SpF and corresponding ARS to conduct the investigations. Contrary to what had been observed since 2007, when all *Bpp* were pertactin (PRN-), **72% of the 2022 isolates turned out to be PRN+** and, at genomic level, they belong to **diverse lineages different from the major lineage that circulated predominantly before 2020**.

In addition to providing **advice to clinicians and microbiologists**, the CNR has **been active with the authorities** (participation in the HCSP working group on pertussis vaccination in pregnant women, and in the advice on what to do in the event of one or more cases of pertussis). In addition, projects on the vaccinology and epidemiology of pertussis and *Bp* were successfully completed, such as the impact of the 2013 vaccine schedule change (Lancet Inf Diseases), the compilation of a *Bordetella* genomic library (Nat Comms) and the impact of acellular vaccines on the evolution of different *Bp* strains (Science Transl Med).

The CNR continues to take part in monitoring cases and any epidemiological changes linked to changes in vaccination strategy, such as the recent vaccination of pregnant women; monitoring antibiotic susceptibility (in particular, the spread of macrolide-resistant strains); and expression of vaccine antigens (in particular, fimbriae and pertactin).

1. Missions et organisation du CNR

ORGANIGRAMME



¹ a remplacé Isabelle MOULHERAT depuis janvier 2023 ; ² a remplacé Sophie GUILLOT depuis janvier 2023.

MISSION ET ORGANISATION

Le CNR est hébergé au sein de l'unité de recherche Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes (BEBP) de l'Institut Pasteur, placée sous la responsabilité de Sylvain BRISSE. Cette équipe assure seule les missions du Centre National de Référence (CNR) de la Coqueluche et autres bordetelloses (CNRCOQ) : il n'y a pas de laboratoire associé. L'organigramme de l'équipe du CNRCOQ est présenté **ci-dessus**.

Deux changements importants sont intervenus au sein du CNRCOQ depuis le versement du dossier de candidature pour le mandat 2023-2027. D'une part, Sophie GUILLOT, responsable adjointe et référente pour les questions microbiologiques jusqu'à fin 2022, a été remplacée le 1^{er} janvier 2023 par Dr Carla RODRIGUES, PhD, docteur en pharmacie spécialisée en microbiologie. La passation de service s'est déroulée avec une période de recouvrement de 6 mois (avril à décembre 2022). D'autre part, Isabelle MOULHERAT, assistante de l'Unité BEBP et du CNRCOQ depuis 2016, a été remplacée par Christèle AUGUSTE en novembre 2022.

Les missions générales du CNRCOQ comprennent l'expertise, le conseil, la surveillance et l'alerte. Ces missions sont détaillées plus spécifiquement en **Annexe 1**.

DEMARCHE QUALITE

Le CNRCOQ fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui étaient au nombre de 14 en 2022. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation. Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, qui apportent ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction Médicale ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Les services supports critiques sont régulièrement audités dans le cadre de leurs activités en interne par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

Les techniques du CNR accréditées sont :

- Recherche et identification moléculaire : bactéries du genre *Bordetella* dont le génome contient une ou plusieurs copies de la séquence d'insertion IS481 ;
- Recherche et identification moléculaire : bactéries du genre *Bordetella* dont le génome contient une ou plusieurs copies de la séquence d'insertion IS1001.

L'ensemble des CNR/CIBU participent annuellement à des contrôles externes de la qualité (CQE). Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Dans le cas où cette organisation est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle pour maintenir les compétences du personnel et du laboratoire.

Lors de la pandémie de COVID-19, les CNR ont été prioritaires dans le Plan de Continuité de l'Activité de l'Institut Pasteur avec un soutien et une mobilisation de l'ensemble des services supports de l'Institut pour le maintien et la continuité des missions du CNR.

L'année Qualité 2022 s'est organisée comme suit :

Étapes clés LREMS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance COFRAC	27 au 29 juin et du 6 au 9 juillet 2022
Revue qualité	21/04/2022
Revue de direction LREMS	23/06/2022
Audits internes qualité (AIQ) et technique (AIT)	AIQ : 09/11/2022 après-midi AIT : 28/11/2022 après-midi
Nombre d'écarts/non-conformités mineurs (E-NC min)	0
Nombre d'écarts/non-conformités majeurs (E-NC maj)	0

Malgré le contexte sanitaire, le LREMS a maintenu son système de management de la qualité et a renouvelé son accréditation COFRAC suite à l'audit en octobre 2020.

Perspectives 2023 :

Étapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité	30/03/2023
Revue de direction LREMS	04/07/2023
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2023
Audit de surveillance COFRAC	Novembre – décembre 2023

La prochaine évaluation par le COFRAC est prévue pour novembre ou décembre 2023.

1.1 Participation du CNR à un contrôle qualité externe

Comme le spécifie la Norme ISO 15189, un contrôle qualité externe (CQE) doit être effectué chaque année. En juin 2022, nous avons participé à un CQE organisé par QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, Glasgow, Scotland) pour l'identification moléculaire de *Bordetella pertussis* (QCMD 2022 *Bordetella pertussis* DNA EQA Programme - QAB094132_1). Le QCMD se composait de 10 échantillons à partir desquels il fallait détecter la présence ou non du matériel génétique de bactéries du genre *Bordetella* et dans un deuxième temps identifier l'espèce par typage moléculaire. La première étape a consisté à extraire l'ADN des 10 échantillons. Nous avons ensuite fait les qPCR qui ciblent l'IS481 et l'IS1001 (PCR très sensibles mais pas spécifiques d'une espèce donnée) et effectué une analyse qualitative. Nous avons obtenu des résultats corrects pour les 10 échantillons au niveau de l'identification du genre *Bordetella*. Dans un deuxième temps, nous avons effectué le typage moléculaire par qPCR en utilisant différentes cibles spécifiques d'espèce (*ptxA-Pr*, *h-IS1001* et *FLA*). Nous avons aussi obtenu des résultats corrects pour les 10 échantillons quelle que soit l'espèce de *Bordetella* à identifier. En conclusion, le CNR a obtenu 100% de résultats corrects au CQE de 2022.

2. Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est donnée en **Annexe 2**. Pas de changements de nos activités d'expertise pour 2022. Le CNRCOQ reste le laboratoire de référence national pour l'identification ou la confirmation moléculaire des différentes espèces de bordetelles. Les demandes de vérification ou de confirmation de l'espèce de *Bordetella* détectée chez un patient proviennent principalement de laboratoires hospitaliers et du secteur privé (laboratoires d'analyses de biologie médicale, LABM).

En cas de signalement par l'Agence Régionale de Santé (ARS) de cas groupés de coqueluche dans une collectivité, en lien avec SpF, le CNR apporte son expertise en vérifiant l'espèce de *Bordetella* responsable de l'infection. En juillet 2022, le CNR a confirmé **un épisode de coqueluche intra familial** (5 cas) à *B. pertussis* (département 17) en lien avec l'ARS de Nouvelle Aquitaine, et a réussi à mettre en culture un des prélèvements. Entre mai et juillet 2022, **plusieurs cas groupés de coqueluche à *B. parapertussis*** ont été détectés, et confirmés par le CNR, dans plusieurs régions de France métropolitaine (Occitanie - 11 cas, Bretagne - 9 cas, Provence-Alpes-Côte d'Azur - 8 cas, Pays de la Loire - 5 cas) dans des écoles maternelles, une crèche multi-entreprise et des enfants gardés chez une assistance maternelle. Le CNR a réussi à cultiver 8 *B. parapertussis* ce qui a permis leur analyse microbiologique (**voir partie 3.2**).

2.1 Evolution des techniques

En 2022, nous avons développé et mis en place de nouvelles approches génomiques (Bridel, Bouchez et al., Nat Commun, 2022) rendues disponibles sur la plateforme BIGSdb-Pasteur (<https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>) pour : **a) le géotypage des souches bactériennes du genre *Bordetella*** (cgMLST *Bordetella*) ; **b) le typage des gènes liés aux antigènes vaccinaux** : promoteur de la toxine pertussis (PT) et sous-unité S1 de la PT; l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) ; et fimbriae ; et c) la **détection de la mutation 23S rRNA associée à la résistance aux macrolides**. Ces approches permettent de déterminer avec une bonne probabilité, l'appartenance de souches de *B. pertussis* à la même chaîne de transmission (Bouchez et al., EID, 2018). Cette plateforme informatique fournit aussi une nomenclature unifiée des souches et des variants alléliques de *B. pertussis* permettant un suivi des souches émergentes à l'international.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

En 2022, le CNRCOQ n'a évalué aucune technique, réactif ou trousse pour le diagnostic de la coqueluche.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous envoyons les modes opératoires décrivant les diagnostics de référence (culture ou qPCR) aux laboratoires hospitaliers ou LABM qui en font la demande. En 2022, nous avons poursuivi notre soutien à la mise en place ou

au maintien de la technique de culture de *Bordetella* (surtout *B. pertussis* et *B. parapertussis*) dans les laboratoires hospitaliers du réseau RENACOQ. À la suite d'un questionnaire dédié à la culture envoyé à nos partenaires en juin 2021, nous avons identifié des actions prioritaires qui ont été discutées avec le réseau lors d'une réunion organisée par le CNRCOQ le 24 juin 2022. Les différentes actions identifiées pour aider à poursuivre la mise en culture des bordetelles ont été mises en place : **i)** diffusion du mode opératoire pour la mise en culture des bordetelles ; **ii)** envoi des références des milieux commerciaux (Bordet-Gengou et Regan-Lowe) approuvés par le CNR, et/ou **iii)** planification de l'envoi par le CNRCOQ aux laboratoires demandeurs de boîtes de Bordet-Gengou et/ou de Regan-Lowe.

2.4 Collections de matériel biologique

Mises en collection

En 2022, nous avons stocké 49 isolats décrits dans la section 2.5.1.

Distribution de souches/ADN

En 2022, nous avons envoyé :

- ✓ 2 ADN (*B. pertussis* et *B. parapertussis*) au Service de Biologie du Centre Hospitalier de Versailles ;
- ✓ 3 souches (*B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. holmesii*) au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Amiens Picardie (site Sud)
- ✓ 2 ADN (*B. pertussis* et *B. parapertussis*) à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

2.5 Activités d'expertises

2.5.1 Nombre d'échantillons cliniques reçus et analysés au CNR en 2022

Pour l'année 2022, nous avons analysé les échantillons suivants :

- 40 isolats de *Bordetella* spp., déjà isolés pour lesquels nous avons confirmé l'identification.
- 9 prélèvements respiratoires positifs à partir desquels nous avons obtenu une culture positive ;
- 21 prélèvements et 19 ADN extraits sur lesquels des PCR ont été réalisées afin de vérifier la présence de l'ADN de *Bordetella* et/ou identifier l'espèce de *Bordetella*.
- 10 échantillons non cultivables mais identifiés comme *Bordetella* par PCR.
- 1 échantillon inexploitable.

L'année 2022 a été marquée par une augmentation (de 127 à 203%) du nombre d'échantillons biologiques envoyés au CNR en 2022 par rapport à 2021 et 2020 (44 en 2021, 33 en 2020, 100 en 2022) ; à noter que les chiffres restent relativement faibles depuis 2020 et que cette augmentation est donc à relativiser.

Analyses réalisées au CNR

Type d'échantillon	Type d'analyse	Délai de rendu des résultats	Nombre d'analyses
Isolats bactériens	Identification de l'espèce par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ou par séquençage génomique (en cas d'une nouvelle espèce)	< 7 jours ouvrées < 28 jours ouvrées	49
	Antibiogrammes	Non applicable	49
	Séquençage génomique : - Génotypage des souches bactériennes (cgMLST) - Typage des gènes d'antigènes vaccinaux - Détection de la mutation 23S rRNA associée à la résistance aux macrolides	Non applicable	49
	Vérification de la production des protéines vaccinales déterminants de virulence	Non applicable	49
Prélèvements respiratoires	Mise en culture	< 12 jours	19
Prélèvements respiratoires et ADN extraits	Confirmation de l'identification moléculaire du genre <i>Bordetella</i> par PCR en temps réel (cibles IS481/IS1001)	< 7 jours	52
	Si la PCR IS481 ou/et IS1001 est (sont) positive(s) : identification de l'espèce de <i>Bordetella</i> par PCR en temps réel (cibles spécifiques d'espèce - <i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>B. holmesii</i> et <i>B. bronchiseptica</i>)	< 7 jours	129

2.5.2 Nombre d'isolats cliniques reçus au CNR en 2022

Les isolats, isolés ou reçus pour confirmation de l'identification au CNR en 2022, sont présentés dans le **Tableau** ci-dessous :

Tableau : Nombre d'isolats reçus ou isolés au CNR en 2022

Source	Espèce	2022
RENACOQ		
	<i>B. pertussis</i>	1
	<i>B. parapertussis</i>	10
HORS RENACOQ (dont Col.BVH, LABM)		
	<i>B. pertussis</i>	1
	<i>B. parapertussis</i>	8
	<i>B. bronchiseptica</i>	18
	<i>B. holmesii</i>	3
	<i>B. hinzii</i>	4
	<i>B. trematum</i>	2
	<i>Bordetella</i> génogroupe 1	2
TOTAL		49

La répartition géographique des isolats en France métropolitaine, toutes espèces du genre *Bordetella* confondues, envoyés par les correspondants du CNRCOQ est présentée dans la **Figure** ci-dessous.

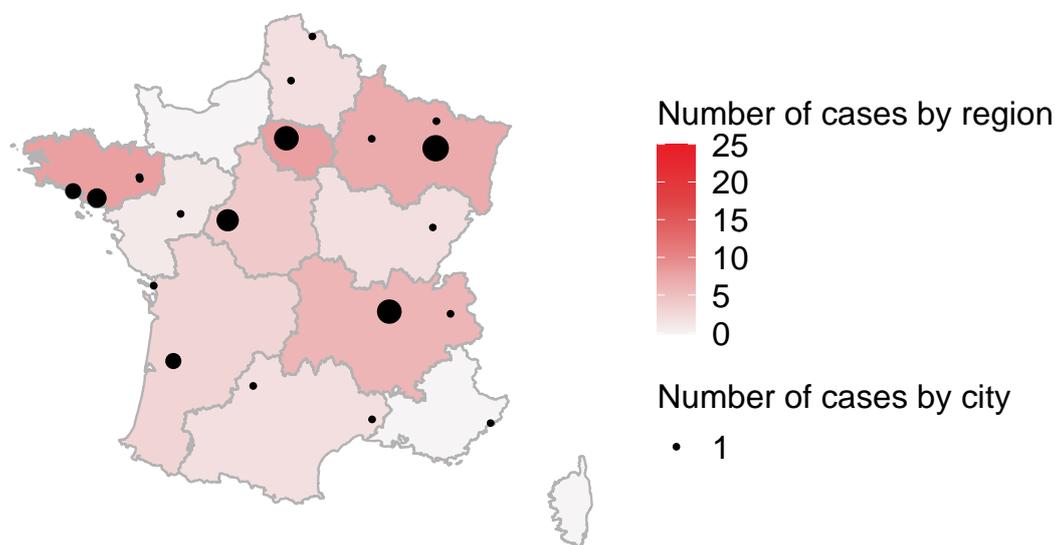


Figure. Répartition géographique en France métropolitaine des isolats de *Bordetella* envoyés au CNR en 2022

(*2 souches isolées dans le territoire d'outre-mer ne sont pas représentées : l'une à la Réunion et l'autre à Mayotte)

2.5.3 Nombre de qPCR réalisées en 2022

Le nombre de qPCR effectuées par le CNR en 2022 est présenté dans le **Tableau ci-dessous**. Pour un échantillon donné, plusieurs qPCR peuvent être réalisées (se reporter à la liste détaillée des cibles PCR dans l'**annexe 2**). Celles-ci ont été réalisées principalement dans le cadre de la surveillance, à la demande des ARS

(notamment lors de cas groupés de coqueluche), et dans le cadre du contrôle externe de qualité (QCMD BPDNA2022).

Tableau : Nombre de qPCR réalisées en 2022

Type de PCR	Nombre
Surveillance	117
Demande des ARS lors de cas groupés	64
Contrôle Externe de Qualité (QCMD)	39
Total	220

2.6 Activités de séquençage

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, précisez quelle(s) plateforme(s)</p> <p>L'Institut Pasteur est doté d'une plateforme interne dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR. La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la <u>technologie Illumina</u> ; la plateforme prend en charge la fabrication des librairies et le séquençage. Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500.</p> <p>Notre unité de recherche BEBP est aussi dotée de la <u>technologie Oxford Nanopore</u> (ONT, 1 MinION, 1 Mk1C) pour le séquençage de longues lectures.</p>

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

<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, précisez quelle(s) plateforme(s)
	Les CNR ont accès aux bio-informaticiens du HUB de Bio-informatique et Bio-statistique de l'Institut Pasteur, qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données brutes sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Depuis 2018, notre CNR est autonome pour l'analyse des séquences génomiques (données Illumina et données ONT).
	Outils utilisés pour l'analyse des séquences : Nous utilisons une combinaison d'outils bio-informatiques en ligne de commande UNIX et en interface graphique. Les outils les plus utilisés sont la plateforme BIGSdb-Pasteur (https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/) pour le génotypage cgMLST, le génotypage des gènes de virulence et antigènes vaccinaux, la détection de la mutation 23S rRNA associée à la résistance aux macrolides, BLASTN et Geneious (extraction des gènes de virulence pour le génotypage). Pour la visualisation des données génomiques nous utilisons iTOL et Microreact.

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

<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Nos méthodes de génotypage cgMLST nous permettent de tester l'hypothèse que certaines souches sont reliées épidémiologiquement (cas groupés) mais aussi de surveiller l'émergence de lignées particulières.

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Typiquement, les séquences sont assemblées (logiciel SPAdes pour données Illumina ou Unicycler pour données ONT plus Illumina) puis les allèles des 2038 gènes du schéma cgMLST_pertussis (Bouchez et al. EID 2018) ou de 1415 pour le cgMLST du genre *Bordetella* (Bridel&Bouchez et al. Nat.Comm. 2022) sont déterminés en utilisant notre base de données d'allèles sur la plateforme BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>) ; une classification phylogénétique peut être réalisée.

Nous déterminons également le statut intègre ou non du gène de la pertactine (PRN) et les allèles des antigènes vaccinaux. Nous procédons à l'analyse génomique du gène de PRN, en particulier, pour comprendre les bases génétiques chez les isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* ne produisant pas cet antigène (PRN-). Nous avons ainsi constitué une base de données génomiques pour les isolats de *B. pertussis* PRN-.

Nous avons aussi développé un système de génotypage de la résistance aux macrolides qui permet de détecter la mutation 23s RNA qui est responsable de la résistance à cette famille d'antibiotiques chez *B. pertussis*. Dans ce cas, les données génomiques sont parfaitement corrélées avec les données phénotypiques.

Pour visualiser les ensembles des données génomiques et mettre en évidence leur corrélation avec les données épidémiologiques et phénotypiques, nous utilisons iTOL et/ou Microreact.

Ces analyses génomiques sont réalisées en première intention.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

18 souches de *B. parapertussis*.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

49 souches de *Bordetella*. Aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues).

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences : génomes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Les séquences sont rendues publiques à l'occasion de nos publications et partagées en amont des publications à des fins de surveillance ou avec nos collaborateurs internationaux.

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Nous déposons les séquences brutes au format fastq dans ENA, et les assemblages sont rendus publics dans ENA et notre plateforme BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>).

Les séquences de 2022 sont stockées dans notre plateforme BIGSdb-Pasteur ; en 2022, 49 séquences ont été introduites. Elles sont partagées à des fins de santé publique ou avec nos collaborateurs.

3. Activités de surveillance

En 2022, la circulation de *B. pertussis*, l'agent principal de la coqueluche, **reste très faible**. Au CNRCOQ, seulement **deux souches** ont été reçues ou isolées. Cependant, les caractéristiques génomiques (*ptxP3*, *ptxA1*) et l'expression des antigènes de virulence (PT+, FHA+, FIM3 et 1 isolat PRN- et 1 autre PRN+) restent **très similaire** au scénario observé avant la période COVID19.

En revanche, les printemps et début d'été de 2022, ont été marqués par une **réémergence de *B. parapertussis***, le second agent de la coqueluche, généralement associé à des infections moins sévères. Ces données sont en phase avec les observations des LABM Cerballiance et Eurofins (voir section 3.5). Le CNRCOQ a reçu ou isolé **18 souches de *B. parapertussis*** qui ont été étudiées au niveau génomique et du statut de production de pertactine (PRN). Contrairement à ce qui était observé depuis 2007 où tous les *B. parapertussis* étaient PRN-, **72% des isolats de 2022 se sont révélés PRN+** et, au niveau génomique, ils semblent appartenir à des **lignées diverses et différentes de la lignée qui circulait majoritairement avant 2020**.

Depuis 2021, la proportion d'isolats de *B. bronchiseptica* impliqués dans des infections humaines et reçus au CNRCOQ augmente progressivement (n=18), avec une diversité de lignées qui circulent.

3.1 Description du réseau de partenaires

Les échantillons biologiques reçus pour expertise par le CNR comprennent des isolats cliniques et des prélèvements biologiques (aspirations ou écouvillons nasopharyngés, expectorations, ADN extraits de prélèvements respiratoires). En 2022, nous avons reçu 100 échantillons biologiques qui proviennent essentiellement de :

- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. parapertussis* hospitalisés et dont les échantillons sont collectés par les cliniciens du réseau RENACOQ (n=19, 19%)
- ✓ Patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (par exemple crèche, établissements scolaires, collectivités type EHPAD) – demandes ARS (n=20, 20%)
- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. parapertussis* et dont les échantillons sont collectés par les LABM (surtout Cerballiance et Eurofins) et envoyés au CNRCOQ pour la mise en culture (n=25, 25%)
- ✓ Patients ou animaux infectés par *B. bronchiseptica* ou par d'autres espèces de bordetelles et envoyés, le plus souvent, par les bactériologistes du Col.BVH (n=36, 36%)

Par ailleurs, l'unité de recherche reçoit des prélèvements dans le cadre de la surveillance organisée via le réseau ACTIV (n=1 en 2022), qui ne sont pas comptabilisés dans les tableaux et figures de ce rapport.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1. Surveillance moléculaire de *Bordetella*

La **Figure ci-dessous** montre l'évolution du nombre de PCR et sérologies réalisées de 2006 à 2022. On observe que le nombre de sérologies demandées au CNR est quasi nul depuis 2014. Cette évolution fait suite aux recommandations du HCSP de ne pas réaliser les sérologies en pratique courante (http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/hcspr20140710_conduitenircascoqueluche.pdf). Elles ne sont plus réalisées en routine du CNRCOQ depuis 2017.

On observe une importante augmentation du nombre de PCR réalisées en 2021 et 2022, qui avait chuté à la suite du contexte de pandémie de COVID-19, mais ce nombre reste assez faible par rapport à la période antérieure à 2020. Ces données reflètent le caractère cyclique de la coqueluche (cycles de 3 à 5 ans) et la circulation encore faible de *B. pertussis* et *B. parapertussis* à l'heure actuelle. Une reprise importante de la coqueluche pourrait survenir au vu de ces données, mais elle n'est pas encore observée à mi-2023.

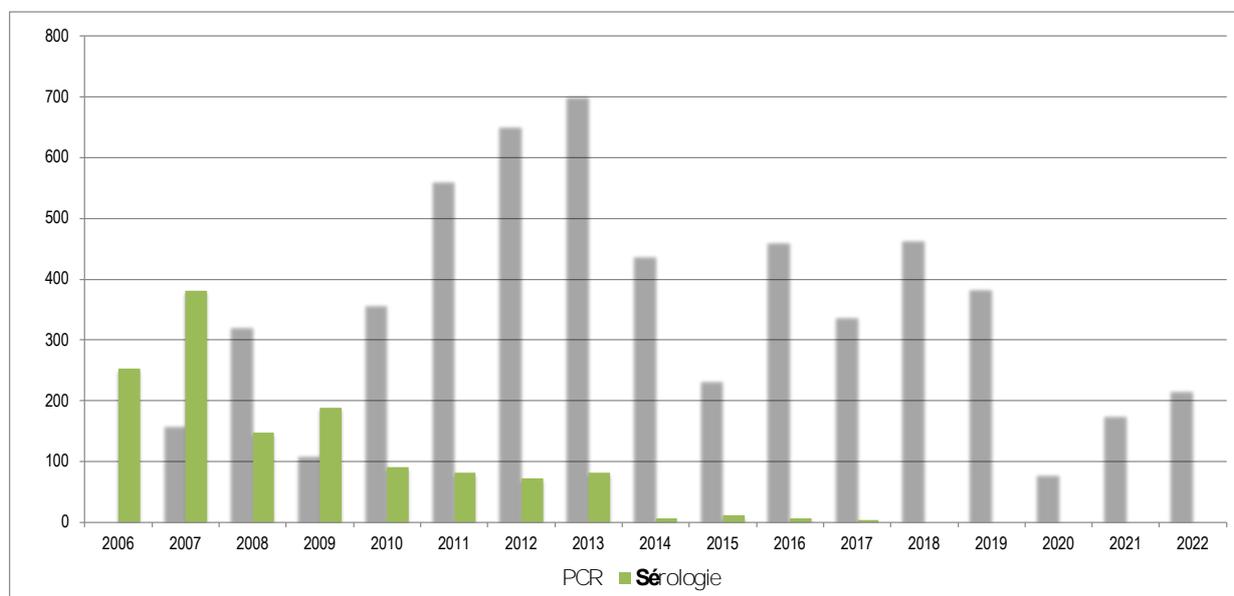


Figure. Nombre de PCR et de sérologies réalisées par le CNR depuis 2006

Parmi les **40 prélèvements ou ADN extraits analysés au total en 2022**, nous avons obtenu (hors doublons) :

- 2 PCR positives à *B. pertussis* (1 enfant de 6 ans et un adulte de 34 ans ; Lyon)
- 14 PCR positives à *B. parapertussis* (13 enfants d'âge moyenne de 5 ans et 1 nourrisson de 1 mois, plusieurs régions de France métropolitaine)
- 1 PCR positive à 2 espèces de *Bordetella* : *B. pertussis* et *B. parapertussis* (1 enfant de 4 ans, Lyon)
- 11 PCR positives à *Bordetella* (IS481 ou IS1001 positives) pour lesquelles l'espèce n'a pas pu être précisée (2 adultes de 33 et 57 ans ; 1 nourrisson de 8 mois et 8 enfants d'âge moyenne de 4 ans ; plusieurs régions de France métropolitaine)
- 9 PCR négatives à *Bordetella*.

3.2.2. Surveillance des souches de *Bordetella* reçues ou isolées au CNR

La répartition des isolats par espèce est présentée dans la **Figure ci-dessous**. On observe une augmentation du nombre d'isolats reçus ou isolés au CNR en 2022 par rapport à 2020 et 2021. Cependant, il convient de noter la différence entre les espèces reçues ou isolées en 2022 et la période antérieure à 2019, où *B. pertussis*, principal agent de la coqueluche, représentait 70 % des isolats traités au CNR. En 2022, *B. pertussis* ne représentait que 4 % des isolats traités au CNR, contrairement à *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* qui représentaient ensemble 74% des isolats (37 % chacun).

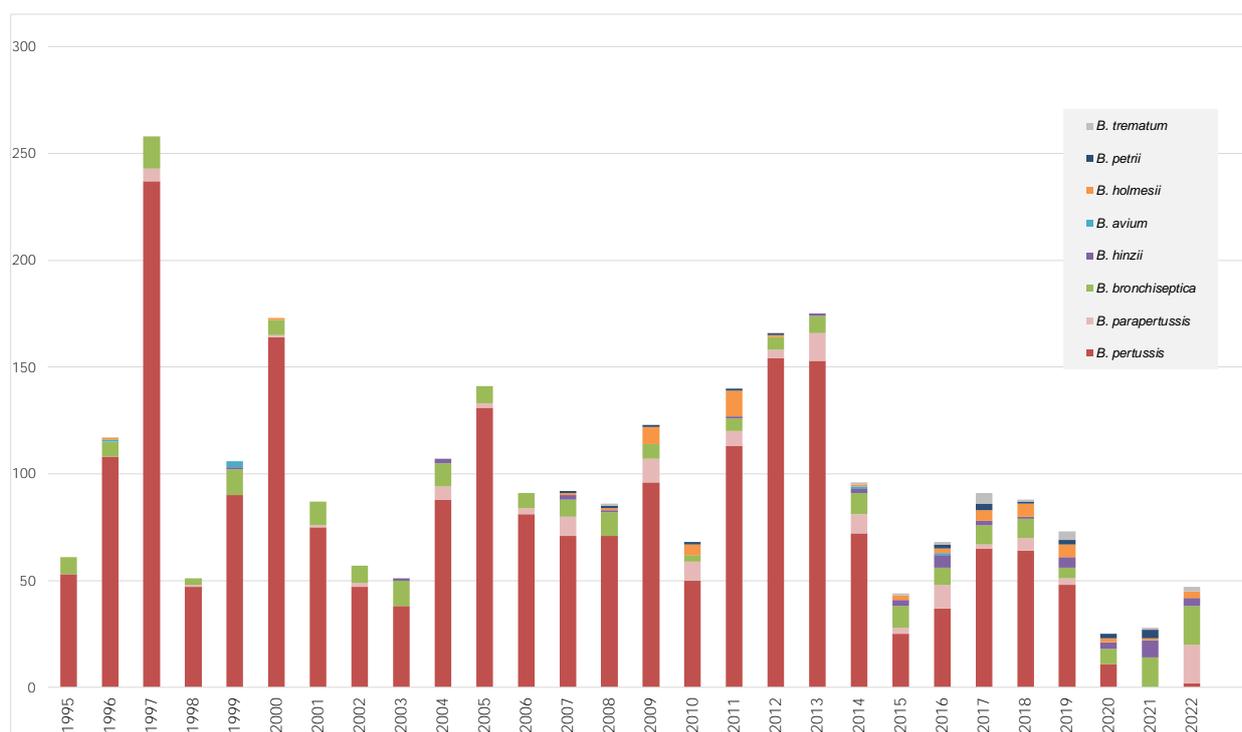


Figure. Répartition des isolats de *Bordetella* reçus au CNR depuis 1995

3.2.3. Diversité phylogénétique des souches isolées ou cultivées au CNR en 2022

La diversité des 49 souches de *Bordetella* reçues au CNR en 2022 a été étudiée par génomique. La **Figure ci-dessous** présente un arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences des 1415 gènes constituant le schéma cgMLST du genre *Bordetella*. Les génomes en noir représentent le jeu de données de référence utilisé dans la publication Bridel, Bouchez *et al.* (Nat Commun, 2022) ; en bleu sont représentés les génomes des isolats reçus ou cultivés au CNR en 2022.

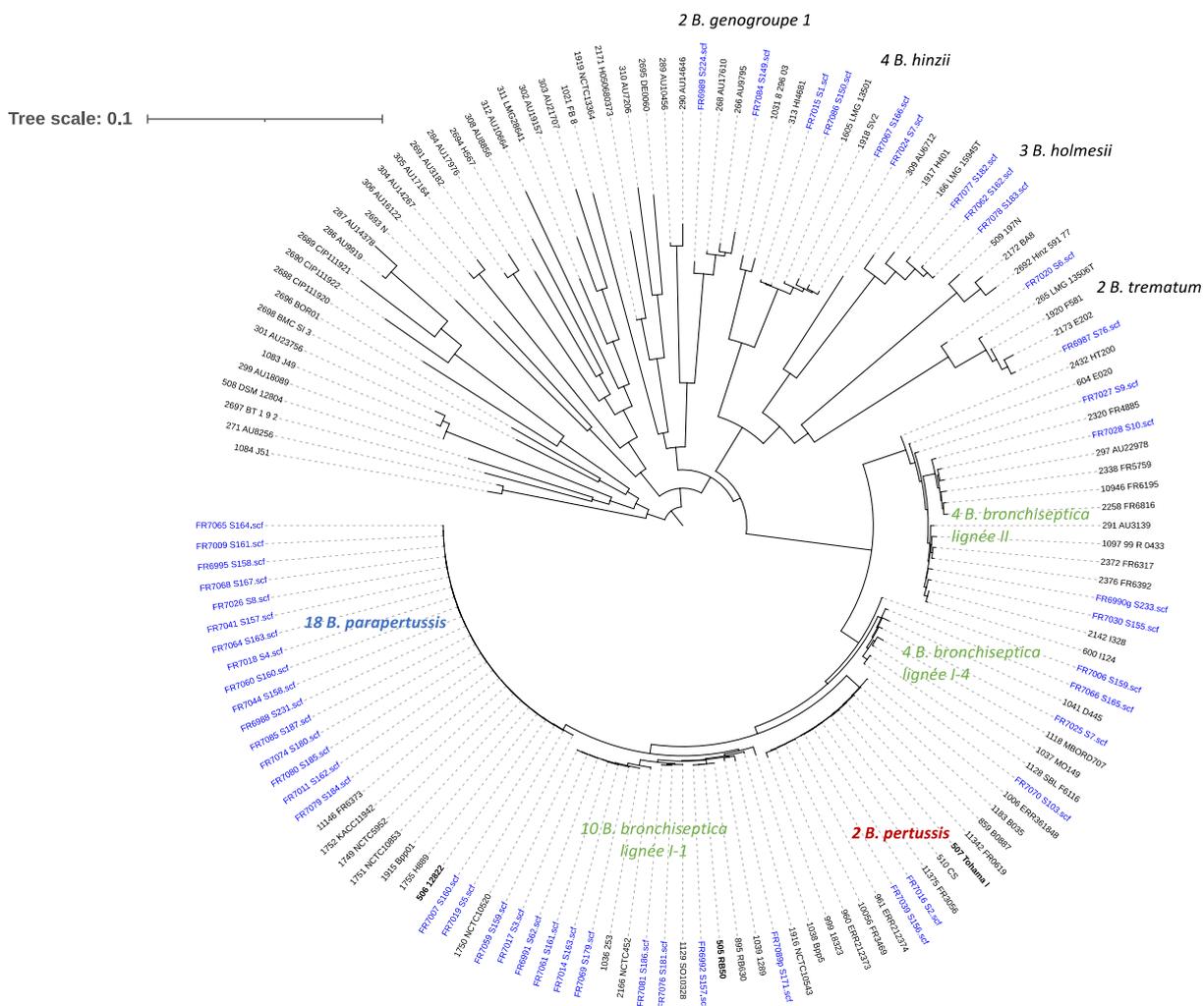


Figure. Arbre phylogénétique déduit de l'analyse génomique des isolats de *Bordetella* reçus au CNR en 2022

3.2.4. Surveillance de la coqueluche : *B. pertussis* et *B. parapertussis*

L'évolution du nombre d'isolats par espèce de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus ou isolés chaque année au CNR depuis 1995 est présentée dans le **Figure ci-dessous**. L'épidémiologie de la coqueluche évolue selon des cycles de 3 à 5 ans. Le dernier cycle épidémique en France semble correspondre aux années 2015-2020 avec un pic à cheval sur 2017 et 2018. En 2022, nous n'avons observé quasiment aucun cas de coqueluche à *B. pertussis*, mais nous avons observé entre mai et juillet de 2022 un pic de cas de coqueluche à *B. parapertussis* (voir section 4 – Alertes)

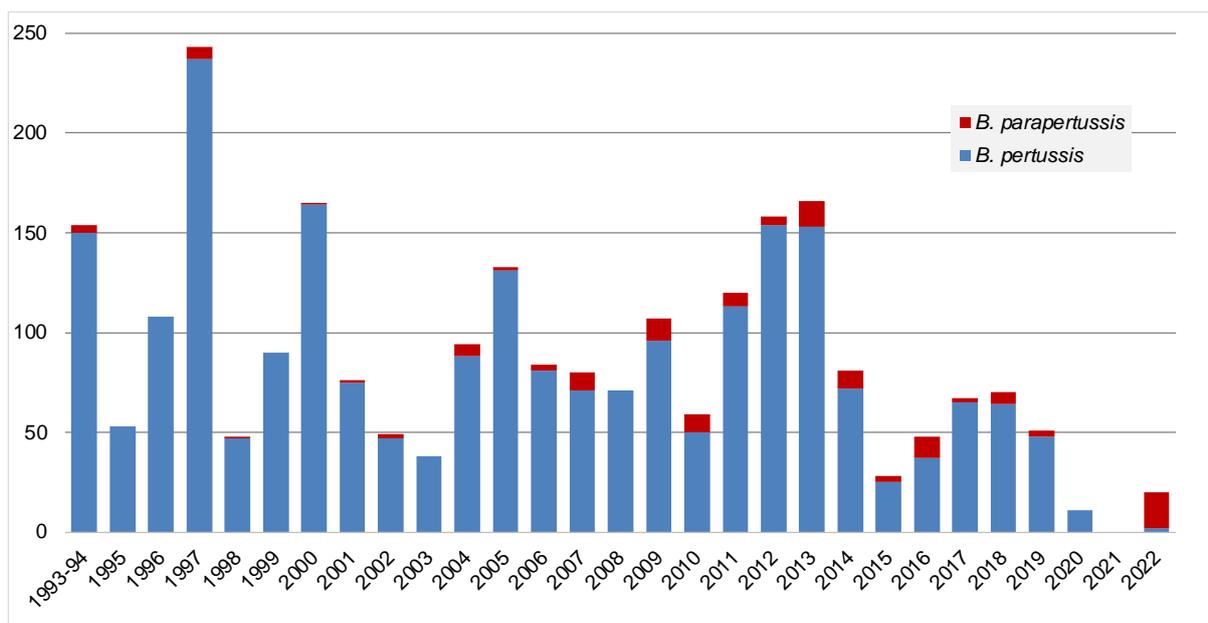


Figure. Répartition des isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus ou isolés au CNR entre 1993 et 2022

1. *B. pertussis*

Depuis 2020, le nombre de souches de *B. pertussis* reçues ou cultivées a fortement chuté par comparaison avec les années précédentes (n=11 en 2020 ; n = 0 en 2021 ; n=2 en 2022). On peut y voir un effet combiné de la fin du cycle épidémique 2015-2020 et du contexte sanitaire exceptionnel dû à la COVID-19.

En 2022, nous avons reçu et/ou isolé seulement **2 isolats de *B. pertussis***, l'un envoyé par des bactériologistes du réseau RENACOQ (La Rochelle, liée à l'épisode de coqueluche intra familial en juillet) et l'autre par un LABM de Nice (en mai). L'âge des patients était respectivement 2 mois et 81 ans.

Surveillance de l'évolution des antigènes : La surveillance des antigènes vise à caractériser une possible évolution des populations par divergence antigénique ou perte de l'expression des antigènes, sous pression de sélection induite par la vaccination des populations. Les vaccins coqueluche sous-unitaires utilisés en France sont soit bivalents (PT + FHA ; *PENTAVAC/TETRAVAC*®, *HEXYON*), soit trivalents (PT, FHA, PRN ; *INFANRIX*®, *BOOSTRIX*®), soit pentavalents (PT + FHA + PRN + FIM2 + FIM3 ; *REPEVAX*®). Le vaccin *VAXELIS*® et *REPEVAX*® introduit en France en 2016 et 2022, respectivement, sont des vaccins contre la coqueluche de type pentavalent.

- **TOXINE DE PERTUSSIS (PT) :** La dernière souche de *B. pertussis* qui ne produit pas la toxine de pertussis (PT-) a été collectée en 2018, et entre 1996 et 2019 seulement 5 isolats PT- ont été identifiés au total. En 2022, les 2 souches de *B. pertussis* produisent la PT.

- ✓ **Allèles des gènes codant la toxine PT.** En 2022, l'allèle du gène de la sous-unité S1 de la PT est, pour les 2 souches de *B. pertussis*, de type **ptxA1**.
 - ✓ **Allèles du promoteur de la toxine PT.** Le promoteur *ptxP* (situé en amont de l'opéron *ptx* codant les différentes sous-unités de la PT) montre une variation de séquence dont il a été suggéré (bien que cette proposition soit débattue) qu'elle pourrait entraîner une variation du niveau d'expression du gène et donc de la production de la toxine. Depuis 1993, une augmentation régulière des souches possédant l'allèle *ptxP3* du promoteur de l'opéron codant la PT est observée. En 2022, les 2 souches analysées sont de type **ptxP3**, comme les années précédentes.
- **PERTACTINE :** Depuis 2007, des souches de *B. pertussis* ne produisant pas l'antigène vaccinal pertactine (PRN) sont observées en France. La proportion des souches qui ne produisent pas PRN (PRN-) continue à augmenter, de 48,4% en 2018 à 52,1 % en 2019. De multiples lignées PRN- ont évolué indépendamment. La non-production de la pertactine est due surtout à deux principaux événements génomiques : l'insertion d'une IS481 au sein du gène *prn* ou une inversion de séquence (22 kb) qui affecte la séquence promotrice de la pertactine. D'autres événements génomiques minoritaires (délétions, mutations) sont observés au sein du gène *prn* ou de son promoteur pour les autres isolats PRN-. En 2022, une de souche reçue était PRN – (par l'insertion d'une IS481 au sein du gène *prn*) et l'autre était PRN+.
 - **FIMBRIAE DE TYPE 2 ET 3 :** les isolats de *B. pertussis* peuvent exprimer deux fimbriae différents, FIM2 et FIM3, le plus souvent de manière exclusive, ou très rarement en combinaison. Pour la période 2017-2021, les isolats produisent majoritairement la protéine fimbriale FIM3. Les 2 isolats de 2022 produisent FIM3.
 - ✓ **Allèles de *fim2* et *fim3* :** les 2 souches de *B. pertussis* en 2022 portent les allèles *fim2*-1 et *fim3*-1.
 - **HAEMAGGLUTININE FILAMENTEUSE (FHA).** De la même façon que pour les souches PT-, les souches de *B. pertussis* FHA-négatives (FHA-) sont rares, la dernière identifiée en France datant de 2013. Entre 1996 et 2019, au cours de la même étude rétrospective citée ci-dessus, nous avons identifié au total 5 isolats FHA-. En 2022, les 2 souches de *B. pertussis* produisent la FHA.

2. *B. parapertussis*

B. parapertussis est aussi responsable de syndromes coquelucheux, normalement moins sévères. Malgré une légère augmentation de ces infections à partir de 2007, son incidence restée faible comparée à celle de *B. pertussis*. Cependant, en 2022, nous avons reçu et/ou isolé **18 isolats de *B. parapertussis***, pour lesquels 56% ont été envoyés par les bactériologistes du réseau RENACOQ (Tours, n=4 ; Vandœuvre-lès-Nancy, n=3 ; Lyon, n=1 ; Angers, n=1 ; Amiens, n=1). Les autres isolats (n=8) ont été envoyés par les laboratoires du Groupe

Hospitalier Sud Bretagne (Lorient, n=3), le CHU Carémeau (Nîmes, n=1), l'hôpital Bicêtre AP-HP (n=1, Le Kremlin-Bicêtre), et le LABM Cerballiance (n=3), surtout en liaison avec les ARS (voir section 4).

L'âge des patients à partir desquels les isolats de *B. paraptussis* ont été collectés, était :

- ✓ 8 nourrissons entre 2 et 10 mois ;
- ✓ 9 enfants entre 2 et 9 ans (âge moyen de 4 ans) ;
- ✓ 1 adulte de 34 ans.

Surveillance de l'évolution des antigènes

- **PERTACTINE** : Il est important de noter que 99% (87 sur 88) des isolats de *B. paraptussis* circulant en France depuis 2007 ne produisent pas la pertactine. Cependant, en 2022, **72% (13/18)** des isolats *B. paraptussis* **produisent PRN** dont 4 appartiennent à une lignée 'ancestrale' (voir Figure arbre phylogénétique ci-dessous). Pour les **5 (28%)** isolats de *B. paraptussis* qui sont PRN-, la **non expression de la PRN** est liée à une mutation connue (*prn::ΔG -1895*), comme la majorité des isolats *B. paraptussis* collectés en France depuis 2007.

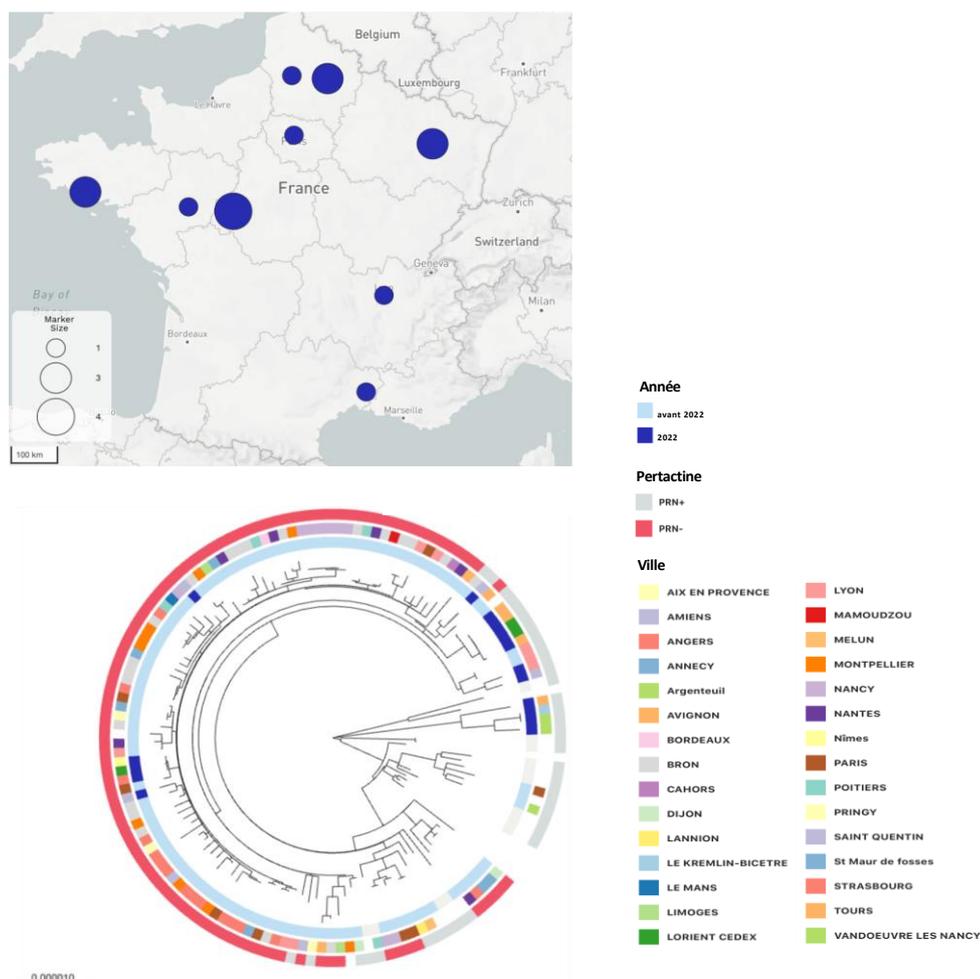


Figure. Distribution géographique et arbre phylogénétique déduit de l'analyse génomique des isolats de *B. paraptussis* reçus au CNR en 2022 (outil : Microreact)

3.2.5. Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

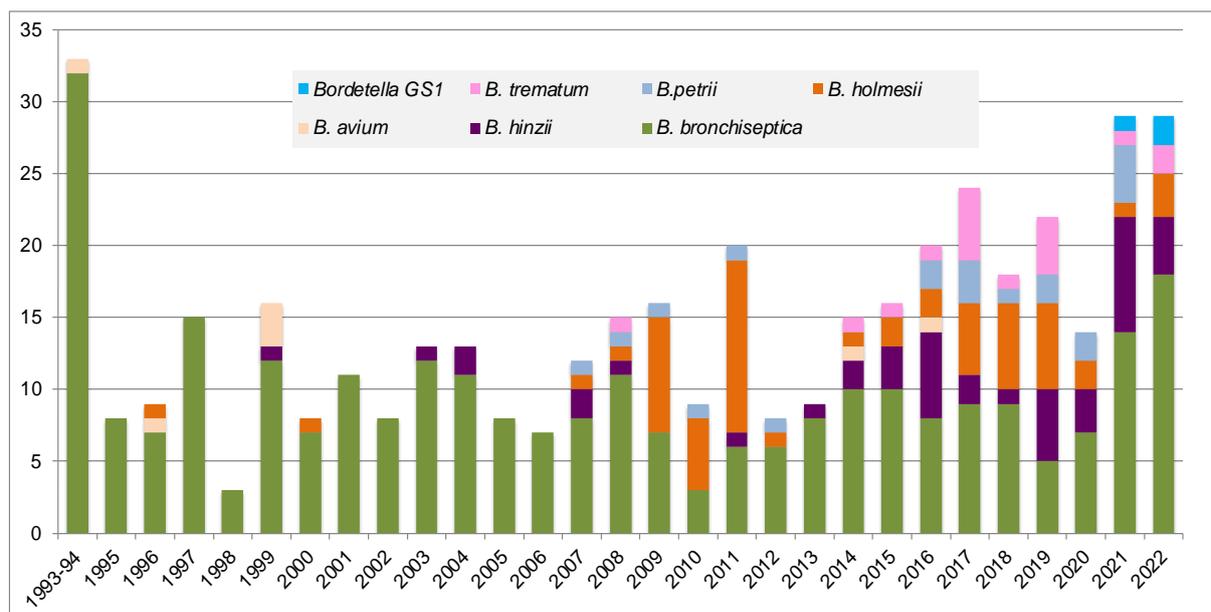


Figure. Nombre d'isolats de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1993, hors *B. pertussis* et *B. parapertussis*

Nous avons reçu des isolats des autres espèces de *Bordetella* (n=29, **Figure ci-dessus**), en provenance principalement des hôpitaux du Col.BVH. Il se répartissent comme indiqué ci-dessous.

- **18 isolats de *B. bronchiseptica*** d'origine humaine en provenance des :
 - i. Hôpitaux de Suresnes (n=4), de Vandœuvre-lès-Nancy (n=3), de la Croix Rousse à Lyon (n=3), de Versailles (n=1), de Bordeaux (Hôpital Pellegrin, n=1), d'Armentières (n=1), de Nevers (n=1) et de St Pierre de la Réunion (n=1) ;
 - ii. LABM de Lyon (n=1), Noyal-Châtillon-sur-Seiche (n=1) et Albertville (n=1).

B. bronchiseptica est un agent pathogène du tractus respiratoire de nombreux mammifères, dont l'homme. Chez ce dernier, la bactérie se comporte comme un pathogène opportuniste, atteignant généralement des sujets immunodéprimés ou présentant une atteinte respiratoire préalable. La bactérie, dans le cas de sujets immunodéprimés, peut induire des infections persistantes, à la différence de *B. pertussis* et *B. parapertussis*. En 2022, il s'agit principalement de cas d'infections respiratoires chez des adultes âgés de plus de 50 ans (n=16/18, les âges se répartissent entre 40 et 86 ans, âge médian de 74 ans) avec une comorbidité sous-jacente (par exemple, BPCO ou mucoviscidose). Concernant la phylogénie, 56% (10/18) des isolats appartiennent à la lignée I-1 ; 22% (4/18) à la lignée I-4 et les 22% restants à la lignée II (**voir Figure en section 3.2.3**).

- **3 isolats de *B. holmesii*** provenant des hémocultures du même patient (50 ans) réalisées à des dates différentes (entre juillet et septembre) en provenance d'un LABM de Vannes. *B. holmesii* a été décrite pour la première fois en 1995 et cause généralement des bactériémies chez des patients immunodéprimés, notamment aspléniques ou drépanocytaires. Dans le cas de 2022, il s'agissait d'un

patient avec endoprothèse vasculaire et ayant des antécédents de lymphome (en rémission depuis 2014).

- **4 isolats de *B. hinzii*** en provenance des hôpitaux de Versailles, de Bordeaux (Hôpital Pellegrin), de Vantoux (Hôpital Robert Schuman) et de Rennes (CHU Rennes site Sud). *B. hinzii* est impliquée dans les infections respiratoires chez les volailles. Quelques cas d'infection pulmonaire ou digestive et de bactériémies ont été décrits chez l'homme. En 2022, nous avons reçu 4 souches de *B. hinzii* isolées chez des patient(e)s adultes âgés de plus de 45 ans (moyenne de 62 ans, surtout dans des prélèvements respiratoires), et dans trois cas associés à des infections digestives (2 cas en contexte d'alcoolisme chronique).
- **2 isolats de *B. trematum*** en provenance des hôpitaux de Suresnes (patient de 84 ans) et de Saint-Laurent-du-Maroni en Guyane (hémoculture d'un patient de 38 ans). La première description de *B. trematum* a été faite en 1996. La bactérie avait été isolée à partir d'infections auriculaires chroniques. Elle est très occasionnellement isolée dans des cas de bactériémies ou d'ulcères chroniques. Dans l'un des cas, le contexte clinique n'était pas disponible, et dans l'autre cas, l'isolat était associé à une colonisation et non à une infection.
- **2 isolats de *Bordetella* génogroupe 1** en provenance des hôpitaux de Cahors (patient de 58 ans) et de Besançon (patient de 53 ans). Le premier cas concernait un patient atteint de COVID-19 en réanimation avec détresse respiratoire. Dans le second cas, l'isolat a été retrouvé dans le liquide synovial d'un patient hospitalisé présentant une fistule avec écoulement purulent. Au total, le CNRCOQ a identifié 3 cas en France d'infections liées à *Bordetella* génogroupe 1 depuis 2021, et reste très attentif à l'émergence de cette espèce de *Bordetella*.

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Il n'existe pas de critères spécifiques pour l'interprétation de l'antibiogramme de *Bordetella*, nous utilisons le référentiel CA-SFM 2013, section 'Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques' (https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/07/CASFM_2013.pdf, Tableau III).

Macrolides. Des *B. pertussis* résistants aux macrolides circulent à haut niveau en Chine. Il est important de surveiller l'introduction et la diffusion de telles souches en France. Un isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides avait été isolé en 2011, pour la première fois en France et en Europe (Guillot et al., Emerg Infect Dis. 2012). Depuis, nous n'avons pas observé de nouveau cas de *B. pertussis* résistant aux macrolides en France, y compris en 2022.

Céfalexine. Il est important de vérifier la résistance des isolats à cet antibiotique car il est ajouté dans les milieux sélectifs pour la culture des bordetelles. Au CNR nous cultivons les souches en parallèle avec et sans cet antibiotique. En 2022, comme c'était le cas les autres années, tous les isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* présentaient une résistance naturelle à la céfalexine.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

1. Réseaux Nationaux

Réseau RENACOQ : Notre CNR poursuit son implication forte dans le réseau hospitalier pédiatrique RENACOQ. Ce réseau créé en 1996 et coordonné par SpF, et co-coordonné par le CNR pour la partie microbiologique, comprend 42 hôpitaux répartis dans toute la France. Nous continuons à animer le volet biologique du réseau, à apporter nos conseils et notre aide au diagnostic et à confirmer l'identification des isolats de *Bordetella* que nous recevons. Par ailleurs, nous poursuivons notre soutien à la mise en place ou au maintien de la technique de culture de *B. pertussis* et *B. parapertussis* dans les laboratoires hospitaliers. Par suite d'un questionnaire dédié à la culture envoyé à nos partenaires en juin 2021, le CNR a organisé une réunion le 24 juin 2022 pour échanger et identifier des actions à mettre en place pour aider à poursuivre la mise en culture de *Bordetella*. Ces actions ont été mise en place en début 2023.

Réseau Sentinelles : Nous continuons à collaborer avec des réseaux de médecine de ville - collaboration avec le réseau Sentinelles (incluant pédiatres et médecins généralistes). Le réseau Sentinelles a pour objectif d'évaluer l'incidence de la coqueluche, de suivre la répartition des cas par âge et d'évaluer l'impact de la politique vaccinale du pays. Un article a été publié en 2022 (doi:10.2807/1560-7917.ES.2022.27.17.2100515) présentant les résultats des 4 premières années de cette surveillance (2017 à 2020). Pour l'année 2022, un seul cas de coqueluche a été enregistré par ce réseau.

Col.BVH : Le CNR continue également à entretenir et renforcer ses liens avec le réseau de microbiologistes du Col.BVH. Ce réseau est très complémentaire au réseau RENACOQ, car il fournit en particulier de nombreuses souches issues d'autres infections que la coqueluche. Une grande partie des souches isolées et envoyées au CNR représentent d'autres espèces que *B. pertussis* et *B. parapertussis*, contribuant à la surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche.

2. Réseaux Internationaux

Projet EUpertStrain. Nous continuons à participer au réseau européen de laboratoires de référence EUpertStrain. Dans ce cadre, nous échangeons des isolats cliniques de *B. pertussis* pour la comparaison des souches à l'échelle Européenne. Le CNR participera à l'étude EUpert V qui vise à évaluer l'augmentation continue des isolats ne

produisant pas la PRN en Europe, à déterminer si ces isolats sont plus fréquemment détectés chez les personnes bénéficiant d'un schéma de vaccination complet et aussi si ces isolats sont associés à une gravité accrue de la coqueluche chez les nourrissons (<12 mois).

Réseau EUpert-LabNet. Nous participons au projet EUpert-LabNet, financé par l'ECDC, visant à coordonner le réseau de laboratoires de surveillance de la coqueluche à l'échelle Européenne, et à intégrer les activités de surveillance microbiologique avec la surveillance épidémiologique. Les objectifs plus spécifiques de ce réseau sont d'évaluer, d'améliorer, d'harmoniser et de diffuser les méthodes de diagnostic et de caractérisation des souches dans les laboratoires de référence européens, par exemple via des EQA. Un EQA pour la détection moléculaire de la résistance aux macrolides, auquel le CNRCOQ a participé, a été fait en juin 2022 et présenté lors de la conférence EUpertStrain.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Partage de données des LABM Cerballiance et Eurofins-Biomnis

Nous interagissons avec les laboratoires de biologie médicale Cerballiance et Eurofins-Biomnis qui réalisent plus de 90% des tests de diagnostic coqueluche en France. Depuis 2018, à la suite d'une réunion avec les laboratoires Cerba et Eurofins, ces laboratoires envoient régulièrement au CNR les données de PCR *Bordetella*. Ces données contribuent à suivre l'évolution de l'utilisation des diagnostics biologiques en France et à la surveillance des cas.

Tableau. Nombre de PCR et taux de positifs ; LABM Cerballiance

Cible PCR	Nombre de PCR réalisées	Nombre de PCR positives (%)
IS481	5 129	18 (0,4%)
IS1001		88 (1,7%)

Le nombre de PCR (IS481/IS1001) réalisées par Cerballiance en 2022 est de 5 129 (**tableau ci-dessus**) ; il a légèrement augmenté par rapport à 2021 (n = 3 616). Sur ces 5 129 PCR, 2,1% étaient positives (majoritairement PCR IS1001), reflétant une circulation plus active de *B. parapertussis* que de *B. pertussis*, surtout pendant le printemps (**Figure ci-dessous**).

Tableau. Nombre de PCR et taux de positifs ; LABM Eurofins-Biomnis

Cible PCR	Nombre de PCR réalisées	Nombre de PCR positives (%)
IS481	7 136	49 (0,7%)
IS1001		173 (2,4%)

Pour le LABM **Eurofins-Biomnis**, sur les 7 136 PCR coqueluche réalisées, 3,1% étaient positives (majoritairement PCR IS1001) (**Figure ci-dessous**), reflétant aussi la circulation plus active de *B. parapertussis*, en accord avec ce qui a été observé au CNR et par le LABM Cerballiance.

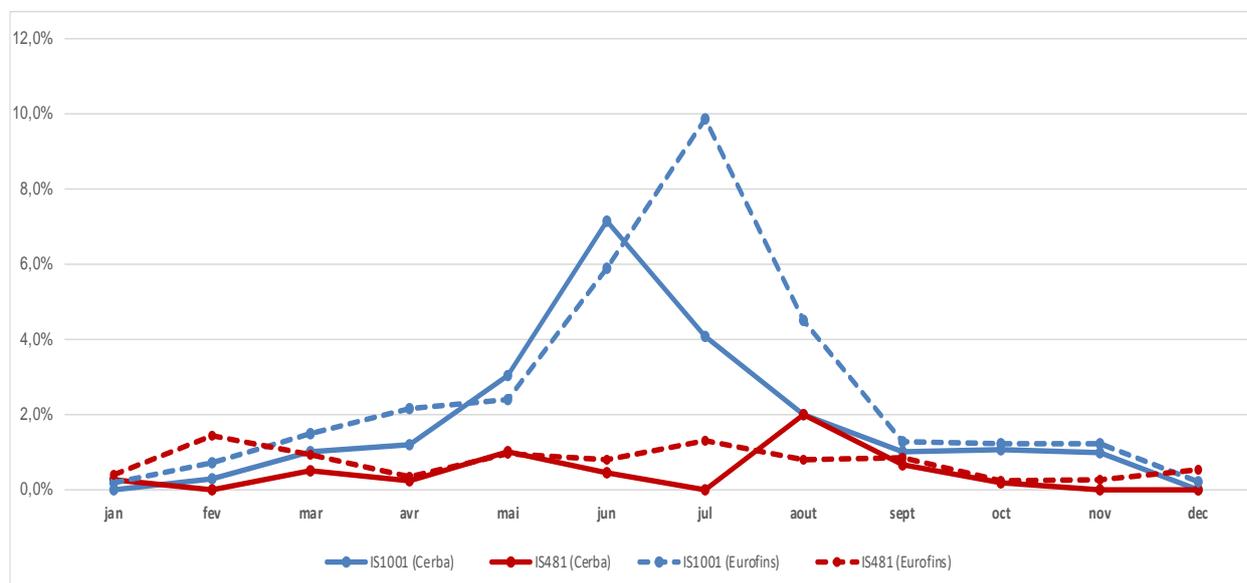


Figure. Pourcentage de PCR coqueluche positives réalisées par les LABM Cerballiance et Eurofins en 2022

Étude multicentrique sur l'association entre la coqueluche maligne et *Bordetella pertussis* productrice de pertactine chez les nourrissons.

Preprint : Leroux P, Matczak S, [Bouchez V](#), Ouziel A, Launay E, Faye A, Rabier V, Sarlangue J, Jeziorski E, Maakaroun-Vermesse Z, Madhi F, Pinquier D, Lorrot M, Pouletty M, Cantais A, Javouhey E, Aït El Belghiti F, [Guillot S](#), [Rodrigues C](#), [Brisse S](#), Cohen JF, [Toubiana J](#), Association between fulminant pertussis and pertactin-producing *Bordetella pertussis* in infants: A Multicenter Study in France, 2008-2019.

Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4451238> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4451238> (en révision dans Lancet Microbe journal)

Cette étude ponctuelle est décrite en détails dans la section recherche (**Voir section 6.1**)

Émergence de *Bordetella parapertussis* en France en 2022 en collaboration avec SpF et ARS

Nous poursuivons la caractérisation au niveau génomique et protéomique (expression des gènes de virulence) des isolats de *B. parapertussis* (n=18) qui ont été responsables des cas groupés dans différentes régions de France entre mai et juillet 2022.

(**Voir section 4 - Alertes**)

4. Alertes

Lors de cas groupés de coqueluche, le CNR demande aux personnels médicaux qui sont à l'origine de l'identification des cas de prévenir SpF et l'ARS. Le CNR envoie par courriel le calendrier vaccinal, la conduite à tenir du HCSP et conseille sur les diagnostics biologiques à utiliser. Le CNR est parfois amené à conseiller sur la prise en charge des patients infectés.

Les alertes ont été rares en 2022 :

- 1) Fin mai 2022, l'ARS d'**Occitanie** nous a signalé 9 cas groupés de coqueluche dans une école maternelle en Lapeyrouse-Fossat, département de Haute-Garonne. Le CNRCOQ a été sollicité pour confirmer l'espèce de *Bordetella*. Des PCR complémentaires (PCR FLA) ont été effectuées sur 7 échantillons positifs et le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. parapertussis* pour 6 cas.
- 2) En juin 2022, l'ARS de **Nouvelle Aquitaine** nous a contacté afin de nous signaler des 5 cas groupés de coqueluche intrafamilial. Le CNR a été sollicité pour confirmer l'espèce de *Bordetella*. Des PCR complémentaires ont été effectuées sur 5 échantillons positifs et le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. pertussis* pour 2 cas et a également réussi à cultiver la souche.
- 3) En fin juin 2022, l'ARS de **Bretagne** nous a signalé 6 cas groupés de coqueluche à *B. parapertussis* au sein de 3 collectivités situées dans le Morbihan. Le CNRCOQ a échangé avec la biologiste de l'hôpital Bretagne Sud mais les prélèvements n'étaient plus disponibles.

Dans le contexte d'une recrudescence des épisodes de cas groupés de coqueluche à *B. parapertussis* (notamment en Occitanie et en Bretagne), SpF a ouvert une fiche alerte le 28 juin 2022 et une conférence téléphonique a été organisée avec SpF, la DGS, le CNRCOQ, l'ARS de Nouvelle Aquitaine et l'ARS Occitanie.

- 4) Début juillet, l'ARS de **Provence - Alpes - Côte-d'Azur** (PACA) a aussi signalé 8 cas de coqueluche à *B. parapertussis* chez des enfants dont 7 étaient scolarisés dans une même école maternelle et chez une animatrice intervenant dans cette école. Le CNR a été sollicité pour confirmer l'espèce de *Bordetella*. Des PCR complémentaires ont été effectuées sur 3 échantillons positifs et le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. parapertussis* pour 2 cas.
- 5) Fin juillet, l'ARS **Pays de la Loire** nous a signalé 5 cas de coqueluche à *B. parapertussis* dans une école. Le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. parapertussis* pour 1 cas.

Les investigations faites conjointement par SpF et le CNR ont fait l'objet d'une présentation orale lors de la 42ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse le 13 décembre 2022 ; « Ré-émergence de *Bordetella parapertussis* en France en 2022 ».

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Le CNR peut être joint par téléphone, aux heures ouvrables, au poste du responsable, des responsables adjointes et du secrétariat. Un numéro de portable est disponible en cas d'urgence. Le CNR peut également être joint par courriel. Ces informations de contact sont disponibles sur le site web du CNR - <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses>. Nous recevons régulièrement ces sollicitations auxquels nous répondons en temps réel.

Les informations concernant la coqueluche et les activités du CNR sont disponibles pour les professionnels de santé et le grand public via notre site web (dernière mise à jour : 07/02/2023) et le dernier rapport annuel d'activité est en ligne sur le site web du CNR.

En 2022, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic et une aide pour l'antibiothérapie lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel. Ils sont moins fréquents que lors de la période précédente, ce que nous attribuons à une meilleure documentation disponible pour les professionnels en amont des appels (site web du CNR : section foire aux questions créée en 2022 ; et conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de coqueluche du HCSP, par exemple).

Tableau. Sollicitations par téléphone ou par courriel en 2022

	2022
Hôpitaux	17
Pédiatres, Médecins généralistes, Biologiste LABM	3
Collectivités	0
Total	20

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- Julie Toubiana a participé au Groupe de travail Haute Autorité de Santé (HAS) « Recommandation vaccinale contre la coqueluche chez la femme enceinte », publié le 12 avril 2022 (https://www.has-sante.fr/jcms/p_3084228/fr/recommandation-vaccinale-contre-la-coqueluche-chez-la-femme-enceinte)
- Julie Toubiana a participé au Groupe de travail Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) « Avis relatif à la conduite à tenir autour d'un ou plusieurs cas de coqueluche », publié le 18 novembre

2022 (<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=1265>) à la suite du signalement de plusieurs cas groupés de coqueluche à *B. parapertussis* détectés entre mai et juillet 2022.

- Les responsables du CNR ont participé à deux réunions avec les ARS, SpF et le DGS-CORRUSS (le 30/06/2022 et le 04/07/2022) pour faire le point sur les cas groupés de *B. parapertussis*.

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

Les médias et le grand public peuvent trouver des informations sur la coqueluche et les autres infections à *Bordetella* ainsi que sur les activités du CNR sur notre site web (<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses>) et celui de l'Institut Pasteur (<https://research.pasteur.fr/fr/nrc/whooping-cough-and-other-bordetelloses/>), auquel nous contribuons. Aucun conseil n'est donné aux personnes qui appellent le CNR. Elles sont renvoyées à leur médecin traitant.

En 2022, Sylvain Brisse a été interviewé par le journal Le Monde (https://www.lemonde.fr/sciences/article/2022/05/11/les-lecons-des-vaccins-contre-la-coqueluche_6125551_1650684.html) suite à l'étude publiée dans *Science Translational Medicine* (Lefrancq N, Bouchez V et al ; 2022, doi: 10.1126/scitranslmed.abn3253) concernant la circulation silencieuse et la dissémination géographique des souches de *B. pertussis*, et la valeur sélective des différentes lignées phylogénétiques face aux vaccins.

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

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

A) Études finalisées au début de l'année 2022 et publiés en 2022 (déjà considéré dans le rapport de renouvellement de mandat)

1. Effet du changement de calendrier vaccinal sur l'épidémiologie de la coqueluche en France : une étude de modélisation et sérologique

Résumé

Contexte : En avril-mai 2013, la France a modifié son calendrier de vaccination contre la coqueluche, qui utilise le vaccin coquelucheux acellulaire, passant de trois doses primaires à l'âge de 2, 3 et 4 mois et un premier rappel à l'âge de 16-18 mois (ancien calendrier) à deux doses primaires à l'âge de 2 et 4 mois et un premier rappel à l'âge de 11 mois (nouveau calendrier). Nous avons cherché à évaluer l'effet du changement de calendrier vaccinal sur l'épidémiologie de la coqueluche en France.

Méthodes utilisées : Dans cette étude de modélisation, en utilisant les données recueillies entre le 1er janvier 2012 et le 31 décembre 2019 à partir des sources de surveillance nationales françaises, nous avons analysé les résultats des tests PCR des écouvillons nasopharyngés prélevés chez des patients ambulatoires symptomatiques âgés de 2 à 20 ans avec une suspicion de coqueluche. Nous avons développé un modèle de régression binomiale négative pour le nombre de cas de coqueluche confirmés par année et par âge afin d'évaluer les risques relatifs de coqueluche en fonction du calendrier vaccinal. Le prédicteur linéaire comprenait l'année, le groupe d'âge, la taille de la population et une approximation de l'immunité décroissante. Nous avons testé différents modèles dans lesquels l'immunité décroissante pouvait varier en fonction du calendrier vaccinal et du type de vaccin primaire. Les modèles ont été ajustés aux données de 2012 à 18 par échantillonnage bayésien de Monte Carlo en chaîne de Markov, et les données de 2019 ont été laissées de côté pour la validation externe du modèle. Nous avons également comparé les concentrations d'anticorps antitoxine coquelucheuse (PT) dans les restes de sérum d'enfants non testés pour la coqueluche ou une infection récente des voies respiratoires âgés de 2 à 5 ans, nés avant et après le changement de calendrier vaccinal.

Résultats : Nous avons recueilli des données sur 7493 cas confirmés de coqueluche. Le modèle qui s'est le mieux adapté aux données épidémiologiques de la période 2012-18 a confirmé que l'immunité diminuait plus rapidement après la vaccination selon le nouveau calendrier vaccinal. 3 ans après la vaccination, le risque de contracter la coqueluche était 1,7 (IC 95% 1,4-2,0) fois plus élevée pour les enfants vaccinés selon le nouveau calendrier que pour ceux vaccinés selon l'ancien calendrier. Le modèle a correctement prédit la répartition des cas par âge en 2019. Les concentrations moyennes géométriques (CMG) d'IgG anti-PT étaient 50 % plus faibles chez les enfants âgés de 2 ans vaccinés selon le nouveau calendrier (CMG=5-85 UI/mL [IC 95 % 4,08-8,39]) que chez les enfants du même âge vaccinés selon l'ancien calendrier (CMG=11-62 UI/mL [IC 95 % 9,05-14,92] ; p=0.0016), et 43% plus faible chez les enfants âgés de 3 ans vaccinés avec le nouveau calendrier (GMC=3,88 IU/mL [95% CI 2,82-5,34]) que chez ceux vaccinés avec l'ancien calendrier (GMC=6,80 IU/mL [95% CI 4,77-9,70] ; p=0-026).

Interprétation : Une protection de plus courte durée induite par le nouveau schéma vaccinal recommandé en France depuis 2013 est associée à une augmentation des cas de coqueluche chez les enfants âgés de 2 à 5 ans. Si des résultats similaires sont observés dans d'autres pays et dans d'autres essais cliniques, ces résultats devraient être pris en compte dans les futures politiques de vaccination contre la coqueluche.

Publication: Paireau J, [Guillot S](#), Aït El Belghiti F, Matczak S, Trombert-Paolantoni S, Jacomo V, Taha MK, Salje H, [Brisse S](#), Lévy-Bruhl D, Cauchemez S, [Toubiana J](#). Effect of change in vaccine schedule on pertussis epidemiology in France: a modelling and serological study. *Lancet Infect Dis.* 2022 Feb;22(2):265-273. doi:10.1016/S1473-3099(21)00267-X. PMID: 34672963.

2. Dynamique spatiale globale et changements de fitness de *Bordetella pertussis* induits par la vaccination

Résumé

Comme pour d'autres agents pathogènes, les interactions compétitives entre les souches de *Bordetella pertussis* déterminent le risque d'infection. On pense que les vaccins perturbent la diversité des souches en modifiant les pressions immunitaires ; cependant, ce phénomène a rarement été mesuré en raison de l'insuffisance des données et des outils analytiques. Nous avons utilisé 3344 séquences provenant de 23 pays pour montrer qu'en moyenne, 28,1 chaînes de transmission circulent dans une région infranationale, le nombre de chaînes étant fortement associé à la taille de la population hôte. Il faut 5 à 10 ans pour que *B. pertussis* soit répartie de manière homogène en Europe, et le même laps de temps est nécessaire pour les États-Unis. L'augmentation de la valeur sélective des souches déficientes en pertactine après la mise en œuvre de vaccins acellulaires, mais la valeur sélective réduite dans les autres cas, peut expliquer la dynamique à long terme des génotypes. Ces résultats mettent en évidence le rôle de la politique vaccinale dans la modification de la diversité locale d'un agent pathogène responsable de 160 000 décès par an.

Publication : Lefrancq N, [Bouchez V](#), Fernandes N, Barkoff AM, Bosch T, Dalby T, Åkerlund T, Darenberg J, Fabianova K, Vestrheim DF, Fry NK, González-López JJ, Gullsby K, Habington A, He Q, Litt D, Martini H, Piérard D, Stefanelli P, Stegger M, Zavadilova J, [Armatys N](#), [Landier A](#), Guillot S, Hong SL, Lemey P, Parkhill J, [Toubiana J](#), Cauchemez S, Salje H, [Brisse S](#). Global spatial dynamics and vaccine-induced fitness changes of *Bordetella pertussis*. Sci Transl Med. 2022 Apr 27;14(642):eabn3253. doi: 10.1126/scitranslmed.abn3253. PMID:35476597.

3. Librairie génomique de *Bordetella*

Résumé

Le genre *Bordetella* comprend des bactéries présentes dans l'environnement et/ou associées à l'homme et à d'autres animaux. Quelques espèces étroitement apparentées, dont *Bordetella pertussis*, sont des agents pathogènes pour l'homme qui provoquent des maladies telles que la coqueluche. Nous avons mis en place une vaste base de données d'isolats et de génomes de *Bordetella* et avons développé des systèmes de génotypage pour le genre et pour le clade *B. pertussis*. Pour générer la base de données, nous avons fusionné des bases de données existantes de l'Université d'Oxford et de l'Institut Pasteur, importé des génomes de dépôts publics et ajouté 83 génomes de *B. bronchiseptica* séquencés dans cette étude. La base de données publique comprenait au moment de l'étude, 2582 isolats de *Bordetella* et leurs métadonnées, ainsi que 2085 génomes (<https://bigsd.b.pasteur.fr/bordetella/>). Nous utilisons le typage par *core genome multilocus sequence typing* (cgMLST) pour développer des systèmes de génotypage pour l'ensemble du genre et pour *B. pertussis*, ainsi que des schémas spécifiques pour définir les profils antigéniques, de virulence et de résistance aux macrolides. Les analyses phylogénétiques nous permettent de redéfinir les relations évolutives entre les espèces connues de *Bordetella* et de proposer de nouvelles espèces potentielles. Notre base de données constitue une ressource extensible pour le génotypage

d'isolats environnementaux et cliniques de *Bordetella*, facilitant ainsi la recherche évolutive et épidémiologique sur la coqueluche et d'autres infections à *Bordetella*.

Publication: Bridel S, [Bouchez V](#), Brancotte B, Hauck S, [Armatys N](#), [Landier A](#), Mühle E, [Guillot S](#), [Toubiana J](#), Maiden MCJ, Jolley KA, [Brisse S](#). A comprehensive resource for *Bordetella* genomic epidemiology and biodiversity studies. Nat Commun. 2022 Jul 1;13(1):3807. doi: 10.1038/s41467-022-31517-8. PMID: 35778384.

B) Études finalisées en 2022 et publiées ou en prépublication en 2023

1. Étude des sérotypes FIM2 et FIM3 de *B. pertussis* : épidémiologie et corrélats biologiques

Ce projet a été réalisé dans le cadre de la thèse de doctorat de Soraya Matczak (Dir : Julie Toubiana).

Résumé

Introduction : *Bordetella pertussis* circule encore dans le monde entier malgré la vaccination. Les fimbriae sont des composants de certains vaccins coquelucheux acellulaires. Des fluctuations de population des sérotypes fimbriaux de *B. pertussis* (FIM2 et FIM3) sont observées, et les allèles *fim3* (*fim3*-1 [clade 1] et *fim3*-2 [clade 2]) marquent une subdivision phylogénétique majeure de *B. pertussis*.

Objectifs : Comparer les caractéristiques microbiologiques et les profils de protéines exprimées entre les sérotypes fimbriaux FIM2 et FIM3 et les clades génomiques.

Méthodes : Un total de 19 isolats a été sélectionné. L'abondance absolue des protéines des principaux facteurs de virulence, l'autoagglutination et la formation de biofilms, la survie bactérienne dans le sang total, la sécrétion de cytokines par les cellules sanguines induites et les profils protéiques globaux ont été évalués.

Résultats : Par rapport à FIM3, les isolats FIM2 ont produit plus de fimbriae, moins de sous-unité 1 cellulaire de la toxine de pertussis et plus de biofilm, mais ils se sont moins auto-agglutinés. Les isolats FIM2 avaient un taux de survie plus faible dans le sang du cordon ombilical, mais induisaient des niveaux plus élevés de sécrétion d'IL-4, d'IL-8 et d'IL-1. Des comparaisons globales du protéome ont permis de découvrir 15 protéines produites de manière différentielle entre les isolats FIM2 et FIM3, impliquées dans l'adhésion et le métabolisme des métaux. Les isolats FIM3 du clade 2 produisaient plus de FIM3 et plus de biofilm que ceux du clade 1.

Conclusion : Le sérotype FIM et les clades FIM3 sont associés à des différences protéomiques et biologiques, qui peuvent avoir des implications sur la pathogenèse et l'émergence épidémiologique.

L'article correspondant est sous presse dans *Microbes & Infection* : Matczak S, [Bouchez V](#), Leroux P, Douché T, Collinet N, [Landier A](#), Gianetto QG, [Guillot S](#), Chamot-Rooke J, Hasan M, Matondo M, [Brisse S](#), [Toubiana J](#). Biological differences between FIM2 and FIM3 fimbriae of *Bordetella pertussis*: not just the serotype. *Microbes Infect.* 2023 May 26:105152. doi: 10.1016/j.micinf.2023.105152. PMID: 37245862.

2. Association entre la coqueluche maligne et *Bordetella pertussis* productrice de pertactine chez les nourrissons : une étude multicentrique

Résumé

Contexte : La coqueluche maligne est la forme la plus grave de la coqueluche. Les facteurs de virulence de l'agent pathogène, *Bordetella pertussis*, peuvent être impliqués dans la gravité de la maladie. Nous avons cherché à évaluer l'association entre la forme maligne et le statut de production de pertactine (PRN) des isolats cliniques de *B. pertussis*.

Méthodes : Les nourrissons de moins de 6 mois présentant une coqueluche et une culture positive de *B. pertussis* entre 2008 et 2019 ont été inclus. Les isolats de *B. pertussis* et les données cliniques ont été collectés par le réseau français de surveillance de la coqueluche. La coqueluche a été définie comme un épisode avec une numération leucocytaire >40 G/L et au moins un des critères suivants : insuffisance respiratoire nécessitant une ventilation non invasive ou mécanique, hypertension pulmonaire, défaillance d'organes multiples, choc nécessitant des agents vasoactifs ou inotropes. La production de PRN a été évaluée par Western blot. Une régression logistique multivariée a été réalisée pour identifier les caractéristiques microbiologiques et cliniques associées à la coqueluche maligne.

Résultats : Nous avons inclus 361 nourrissons (âge médian de 63 jours [intervalle, 15-182]), dont 32 (9 %) ont évolué vers la coqueluche maligne. 81% des isolats responsables produisaient la PRN. Tous les patients décédés (n=10) avaient une coqueluche. Les enfants atteints de forme maligne étaient significativement plus souvent des nouveau-nés (Odds ratio ajusté [aOR] 4,3 ; intervalle de confiance à 95% [IC] 1,7-11,1), des nourrissons ayant un antécédent de prématurité < 34 semaines d'aménorrhée (aOR 13,7 ; 95%CI 2,9-64,0), des nourrissons non vaccinés (aOR 5,9 ; 95%CI 1,2-28,6), et des cas causés par des isolats de *B. pertussis* produisant la PRN (aOR 4,8 ; 95%CI 1,1-21,7).

Interprétation : Dans cette vaste étude multicentrique, le statut de production de pertactine a été identifié comme une caractéristique microbiologique indépendamment associée à la coqueluche maligne.

Preprint : Leroux P, Matczak S, Bouchez V, Ouziel A, Launay E, Faye A, Rabier V, Sarlangue J, Jeziorski E, Maakaroun-Vermesse Z, Madhi F, Piquier D, Lorrot M, Pouletty M, Cantais A, Javouhey E, Aït El Belghiti F, Guillot S, Rodrigues C, Brisse S, Cohen JF, Toubiana J, Association between fulminant pertussis and pertactin-producing *Bordetella pertussis* in infants: A Multicenter Study in France, 2008-2019.

Disponible en SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4451238> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4451238> (en revue dans *Lancet Microbe journal*)

C) Études en cours de finalisation

1. Évolution de *B. parapertussis* face à la vaccination

Nous étudions l'évolution génomique de *B. parapertussis*, l'autre agent de la coqueluche chez l'homme. Cette étude réalisée en collaboration avec les équipes de Juan-José Gonzalez Lopez de l'hôpital Vall d'Hebron de Barcelone (Espagne) et de Dr Michael Weigand du CDC d'Atlanta (USA), a déjà permis de rassembler les génomes de 250 isolats de *B. parapertussis* provenant de France, Espagne et USA. Ces génomes ont permis d'analyser la dynamique d'évolution temporelle de *B. parapertussis* et des

déterminants de la virulence face à la vaccination anti-coqueluche. Une publication est en cours de préparation.

2. Dynamique évolutive des isolats de *B. pertussis* ne produisant pas la pertactine

Comprendre les liens entre la perte d'expression des antigènes et l'efficacité vaccinale est un thème central de recherche appliquée à la santé publique chez *B. pertussis*. Ces recherches apportent des informations nécessaires aux politiques vaccinales et pour les stratégies de développement de nouveaux vaccins. Nous avons montré que sur 23 années de surveillance microbiologique en France, les souches n'exprimant par FHA ou PT sont très rares et il n'y a aucune évidence de transmission de ces variants, qui sont à considérer anecdotiques (Bouchez et al., EuroSurveillance, 2021). En revanche, les isolats n'exprimant pas la pertactine (PRN-) représentent environ 50% des isolats collectés récemment en France. Nous continuons donc à nous intéresser tout particulièrement à la dynamique évolutive des isolats qui ne produisent pas la pertactine (PRN). Un objectif important est de suivre et comprendre l'émergence de ces isolats, qui en France augmentent moins vite en fréquence que dans d'autres pays utilisant des vaccins acellulaires, comme les USA et l'Australie.

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

a) Publications nationales

1. Guillot S. *Bordetella* spp. Remic 2022 (7ème édition). Chapitre 55, pages 579 – 582.

b) Publications internationales

1. Matczak S, Levy C, Fortas C, Cohen JF, Béchet S, Aït El Belghiti F, Guillot S, Trombert-Paolantoni S, Jacomo V, Savitch Y, Paireau J, Brisse S, Guiso N, Lévy-Bruhl D, Cohen R, Toubiana J. Association between the COVID-19 pandemic and pertussis derived from multiple nationwide data sources, France, 2013 to 2020. Euro Surveill. 2022 Jun;27(25):2100933. doi:10.2807/1560-7917.ES.2022.27.25.2100933. PMID: 35748301.
2. Bridel S, Bouchez V, Brancotte B, Hauck S, Armatys N, Landier A, Mühle E, Guillot S, Toubiana J, Maiden MCJ, Jolley KA, Brisse S. A comprehensive resource for *Bordetella* genomic epidemiology and biodiversity studies. Nat Commun. 2022 Jul 1;13(1):3807. doi: 10.1038/s41467-022-31517-8. PMID: 35778384.
3. Debin M, Launay T, Rossignol L, Ait El Belghiti F, Brisse S, Guillot S, Guiso N, Levy-Bruhl D, Merdrignac L, Toubiana J, Blanchon T, Hanslik T. Pertussis surveillance results from a French

general practitioner network, France, 2017 to 2020. Euro Surveill. 2022 Apr;27(17):2100515. doi:10.2807/1560-7917.ES.2022.27.17.2100515. PMID: 35485270.

4. Lefrancq N, Bouchez V, Fernandes N, Barkoff AM, Bosch T, Dalby T, Åkerlund T, Darenberg J, Fabianova K, Vestrheim DF, Fry NK, González-López JJ, Gullsby K, Habington A, He Q, Litt D, Martini H, Piérard D, Stefanelli P, Stegger M, Zavadilova J, Armatys N, Landier A, Guillot S, Hong SL, Lemey P, Parkhill J, Toubiana J, Cauchemez S, Salje H, Brisse S. Global spatial dynamics and vaccine-induced fitness changes of *Bordetella pertussis*. Sci Transl Med. 2022 Apr;27;14(642):eabn3253. doi: 10.1126/scitranslmed.abn3253. PMID:35476597.
5. Paireau J, Guillot S, Aït El Belghiti F, Matczak S, Trombert-Paolantoni S, Jacomo V, Taha MK, Salje H, Brisse S, Lévy-Bruhl D, Cauchemez S, Toubiana J. Effect of change in vaccine schedule on pertussis epidemiology in France: a modelling and serological study. Lancet Infect Dis. 2022 Feb;22(2):265-273. doi:10.1016/S1473-3099(21)00267-X. PMID: 34672963.

c) Communications nationales

1. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors du 17e congrès national de la SFM le 5 octobre 2022 ; « Vaccine-escape evolution of *Bordetella parapertussis* »
2. Soraya MATCZAK : présentation orale lors du 17e congrès national de la SFM le 3 octobre 2022 ; « Association between the COVID-19 pandemic and pertussis in France using multiple nationwide data sources »
3. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors de la 42ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse le 13 décembre 2022 ; « Ré-émergence de *Bordetella parapertussis* en France en 2022 »

d) Communications internationales

1. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors du 13th International *Bordetella* Symposium le 29 juin 2022, « Genomic library of *Bordetella* »
2. Sylvain BRISSE : présentation orale lors du EuPERT Strain – Eupert Genomics le 16 septembre 2022, « Estimating the spatial dynamics of *Bordetella pertussis* - from local transmission to global dissemination »
3. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors du EuPERT Strain – EUPERT GENOMICS le 16 septembre 2022, « Populational changes of *Bordetella* strains circulating before and during the COVID-19 pandemic period in France »

e) Conférences sur invitation

1. Sylvain BRISSE : présentation orale invitée lors du 32nd ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases) le 26 avril 2022, « Genomic tracking of *Bordetella pertussis* antigenic variant emergence in relation to diverse vaccine compositions ».

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

Ces aspects sont peu ou pas pertinents pour la coqueluche, maladie strictement humaine et non transmise par les aliments ou l'environnement.

Bordetella bronchiseptica peut infecter ou être portée par des animaux, mais ces infections sont rarement rapportées. Le CNR reste attentif à ces aspects et est ouvert à des collaborations avec des laboratoires vétérinaires.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

En complément des techniques déjà existantes qui seront maintenues au CNR (voir annexe 2), les développements de méthodes et projets de recherche suivants seront menés.

1. Amélioration de l'identification des espèces de *Bordetella* par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Le CNR/COQ utilise en routine la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics) comme méthode d'identification des bordetelles. Toutefois, dans la base de données Biotyper Compass actuelle (Bruker), seulement 9 des 16 espèces actuellement décrites de *Bordetella* sont incluses. Il est donc nécessaire d'améliorer le contenu de la base de données, surtout pour les espèces moins fréquemment rencontrées mais médicalement pertinentes comme *B. holmesii*, *B. hinzii* et *B. petrii*. Un travail de création de spectres et identification de biomarqueurs de référence sera réalisé.

2. Études taxonomiques des bordetelles

Nous avons récemment montré qu'il existe au moins 20 espèces 'cachées' de *Bordetella*, c'est à dire des espèces repérées par comparaisons génomiques (*genomic species*) mais non encore décrites dans la taxonomie officielle des procaryotes. En effet, seules 16 espèces de *Bordetella* ont actuellement un statut défini sur la taxonomie Procaryote, parmi les 36 espèces génomiques détectées (Bridel, Bouchez et al. Nat Commun 2022 ; <https://www.nature.com/articles/s41467-022-31517-8>). Nous nous intéresserons à celles que l'on trouve en clinique humaine et représentées dans la collection du CNR. Nous utiliserons une approche multidisciplinaire basée sur la caractérisation phénotypique, biochimique, protéomique (à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF) et génomique. Des descriptions taxonomiques de ces nouvelles espèces pourront être menées, si

pertinentes. Ce travail de mises à jour taxonomiques aura des conséquences directes sur le diagnostic et sera lié à notre projet de développement de spectres de référence MALDI-TOF (voir ci-dessus).

3. Séquençage métagénomique de bordetelles directement à partir des prélèvements

La mise en culture étant de moins en moins souvent réalisée, il devient stratégique de pouvoir aussi accéder aux caractéristiques des isolats de l'agent principal de la coqueluche (*B. pertussis*, *Bp*) en réalisant le séquençage génomique directement à partir des prélèvements. Le CNR souhaite évaluer la faisabilité et la sensibilité de cette approche. Pour développer une nouvelle méthode de séquençage des génomes *Bp* directement à partir d'échantillons cliniques respiratoires sans avoir besoin d'une étape de culture, une étape d'enrichissement microbien sera développée afin d'extraire de manière préférentielle l'ADN de *Bp* des échantillons cliniques, et d'éliminer l'ADN humain.

4. Séquençage génomique complet de *Bordetella*

Lors de la mandature précédente, nous avons tiré profit du séquençage génomique Illumina et avons développé et mis en place de nouvelles approches génomiques pour l'identification et le typage de l'ensemble du genre *Bordetella* (Bridel, Bouchez et al. Nat Commun 2022 ; <https://www.nature.com/articles/s41467-022-31517-8>). Cependant, la technologie basée sur les 'short reads' ne permet pas d'accéder à la structure du génome des isolats, qui est très variable à cause des réarrangements causés par la séquence d'insertion multicopies IS481, et qui pourrait être à l'origine de variation d'expression de gènes de virulence ou d'antigènes vaccinaux. Afin d'obtenir des séquences génomiques complètes (circularisées), nous utilisons la technologie ONT. Nous avons obtenu une très bonne qualité d'assemblage grâce à une approche mixte combinant données ONT (flowcell R9 et RBK-004) et Illumina (Bouchez et al. MRA, 2018). Nous poursuivrons cette approche en utilisant les nouvelles flowcells ONT (R10.4) qui apportent une précision de séquençage quasi-maximale.

5. qPCR IS1002 pour améliorer la sensibilité du diagnostic spécifique de *B. pertussis*

Le CNR dispose de plusieurs cibles pour identifier les espèces de bordetelles les plus fréquemment rencontrées, mais les plus sensibles (IS481, IS1001) ne sont pas totalement spécifiques des agents de la coqueluche (*B. pertussis* et *B. parapertussis*). Inversement, la cible *ptxA-Pr* qui permet d'identifier très spécifiquement l'espèce *B. pertussis* n'est pas assez sensible (1 copie par génome) et rend un résultat négatif dans le cas où la quantité d'ADN bactérien présent dans l'échantillon du patient est faible. Cela limite notre capacité à différencier l'espèce *B. pertussis* de celle de *B. holmesii*. Une PCR basée sur la détection d'une séquence d'insertion IS1002, absente du génome de *B. holmesii*, est utilisée par certains laboratoires car elle est plus sensible que la PCR *ptxA-Pr*. Le CNR cherchera à valider et mettre en place cette PCR, ainsi qu'à déterminer la limite basse de détection pour l'espèce *B. pertussis*. A noter, toutefois, que l'IS1002 n'est pas spécifique de l'espèce *B. pertussis* car aussi observée chez *B. parapertussis* et certaines souches de *B. bronchiseptica*. Elle sera donc utilisée en complément avec nos autres approches PCR.

6. Évolution de *B. parapertussis* face à la vaccination et caractérisation de l'épidémie de 2022 en France

Nous étudions l'évolution génomique de *B. parapertussis*, l'autre agent de la coqueluche chez l'homme. Cette étude réalisée en collaboration avec les équipes de Juan-José Gonzalez Lopez de l'hôpital Vall d'Hebron de Barcelone (Espagne) et de Dr Michael Weigand du CDC d'Atlanta (USA), a déjà permis de rassembler les génomes de 250 isolats de *B. parapertussis* provenant de France, Espagne et USA. Ces génomes nous ont permis d'analyser la dynamique d'évolution temporelle de *B. parapertussis* et des déterminants de la virulence, et son éventuelle évolution face à la vaccination anti-coqueluche. Une publication est en cours de préparation.

En parallèle, nous allons poursuivre la caractérisation au niveau génomique et protéomique (expression de gènes de virulence) des isolats de *B. parapertussis* (n=18) qui ont été responsables des cas groupés dans différentes régions de France entre mai et juillet 2022.

7. Caractérisation des facteurs de l'hôte et du pathogène associés à la sévérité des infections à bordetelles

Le phénotype clinique de la coqueluche chez le nourrisson pourrait également être impacté par la variabilité de la réponse muqueuse et systémique de l'enfant vis-à-vis de *B. pertussis*. A travers une approche translationnelle, nous avons pour projet de caractériser les profils d'expression des gènes/protéines des souches de *B. pertussis* actuellement en circulation, identifier les gènes de *B. pertussis* exprimés sur le site de l'infection lors d'une coqueluche sévère et déterminer l'implication des réponses immunitaires systémiques sur la gravité de la maladie. Notre approche repose sur l'établissement d'une biocollection à partir d'une cohorte clinique de coqueluches pédiatriques. Notre ambition est d'identifier de nouvelles cibles vaccinales et de décrire de nouvelles voies immunitaires et signatures de la gravité de la maladie.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Les missions spécifiques du Centre National de Référence de la Coqueluche et autres bordetelloses (CNRCOQ), telles que définies dans le cahier des charges de l'appel à candidature (SPF – 20 janvier 2022) sont de contribuer à l'expertise, aux conseils, à la surveillance et aux alertes.

1. Expertise

- Confirmation de l'identification des souches de *Bordetella* qui circulent en France en différenciant les souches de *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* et *B. bronchiseptica* et autres espèces du genre *Bordetella*
- Contribution à la diffusion des techniques diagnostiques appropriées ;
- Soutien technique pour la mise en place ou le maintien de la culture au sein des laboratoires de bactériologie ;
- Développement de tests de détection rapide et/ou d'outils de diagnostic tardif de la coqueluche ;
- Surveillance de la sensibilité de *Bordetella* aux antibiotiques (surtout aux macrolides), en lien avec le CNR des résistances aux antibiotiques.

2. Conseil

- Proposition des conseils cliniques, diagnostiques et thérapeutiques aux cliniciens ;
- Participation avec SPF aux conseils de santé publique à donner aux cliniciens en cas d'épidémie ;
- Contribution à l'évaluation du programme de vaccination contre la coqueluche et à l'évaluation de l'efficacité des vaccins acellulaires ;
- Contribution, le cas échéant, aux travaux d'expertise nationale ou européenne concernant la vaccination contre la coqueluche.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique en lien avec SpF

- Suivre l'évolution des souches qui n'expriment pas certains antigènes vaccinaux et vérification de la couverture des isolats de *B. pertussis* et d'autres *Bordetella* circulants par les différents vaccins commercialisés en France ;
- Surveillance de la circulation des souches de *Bordetella* en France, en différenciant les souches de *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. holmesii* et autres espèces du genre *Bordetella* ;
- Comparaison de souches françaises de *Bordetella* avec les isolats circulant au niveau européen et mondial ;
- Contribution à la surveillance de *B. pertussis* et *B. parapertussis* par l'animation du volet biologique du réseau hospitalier RENACOQ ;

- Contribution, le cas échéant, au volet biologique des projets de surveillance européenne de la coqueluche ;
- Contribution, le cas échéant, à la mise en place de nouvelles modalités de surveillance de la coqueluche en population générale, en particulier en médecine ambulatoire.

4. Alerte

- Signalement à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel : augmentation inhabituelle du nombre de souches isolées ; apparition de cas groupés ; apparition de souches mutantes de *B. pertussis* (en particulier phénomènes d'échappement aux vaccins) ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), etc.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

--- Section éliminée du rapport public pour raisons de confidentialité. ---

1.3 Locaux et équipements

--- Section éliminée du rapport public pour raisons de confidentialité. ---

1.4 Collections de matériel biologique

Description : nombre de souches, caractérisation

Notre collection de bactéries du genre *Bordetella* regroupe actuellement 2900 isolats, dont 49 inclus de l'année 2022. Nous saisissons systématiquement les données attachées aux isolats dans une base de données unifiée en utilisant l'application informatique Lagon. Les souches sont également séquencées et caractérisées phénotypiquement (voir section 2.5).

Conditions de stockage

Tous les isolats de notre collection sont stockés à -80°C, chacun en double dans des congélateurs différents branchés sur une ligne électrique indépendante et sous surveillance électronique 24h/24h par un système d'alarme géré par le logiciel THERMOCLIENT. Un stock de chaque isolat est également conservé systématiquement dans l'azote liquide. Des isolats de référence ont aussi été déposés au Centre de Ressources Biologiques de l'Institut

Pasteur (CRBIP) et à la collection suédoise de Göteborg. La durée de conservation des isolats est au moins de 12 ans en milieu BSA/SPG à -80°C. En revanche, cette durée semble décroître avec le temps lorsque les isolats sont conservés sous forme lyophilisée (chute de plusieurs ordres de grandeurs en vingt ans) ; cette méthode n'est donc plus utilisée.

Conditions de mise à disposition de ces collections

Cet aspect est décrit dans le chapeau introductif générique à tous les CNR de l'Institut Pasteur (Annexe 3, rapport de renouvellement du CNR 2023-2027). Le CNRCOQ se conformera à la politique décrite, et s'engage à respecter les dispositions du Décret n°2016-806 du 16 juin 2016 en matière de collections.

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

Depuis 2022, le CNRCOQ s'appuie sur le CRBIP pour la distribution de souches de référence de *Bordetella* (voir ci-dessous, https://catalogue-crbip.pasteur.fr/recherche_catalogue.xhtml), ou pour l'obtention de souches d'autres origines à des fins d'études comparatives.

- *B. pertussis* : CIP 81.32
- *B. parapertussis* : CIP 64.11T
- *B. holmesii* : CIP 104394T
- *B. bronchiseptica* : CIP 55.110T

Bases de données de séquences génomiques

Depuis 2016, les isolats sont systématiquement séquencés par technologie Illumina, qui fournit à la fois le génotypage et les séquences de gènes importants pour le suivi de l'efficacité vaccinale. Le CNR a mis en place une librairie génomique des *Bordetelles* afin de regrouper les séquences génomiques de ce genre et de rendre accessible en ligne publiquement les séquences alléliques des gènes d'intérêt (typage, virulence, antigènes vaccinaux, résistance). Ce travail de compilation (Bridel, Bouchez *et al.*, Nat Commun 2022) a permis la mise à jour de la nomenclature des espèces génomiques, lignées phylogénétiques et groupes clonaux dans le genre *Bordetella* et a permis une harmonisation des analyses génomiques. Les 2085 génomes assemblés (format fasta) de *Bordetella* étudiés dans publication (comprenant 332 génomes du CNRCOQ) sont accessibles publiquement sur la plateforme BIGSdb (https://bigbdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigbdb/bigbdb.pl?db=pubmlst_bordetella_isolates&page=query&project_list=27&submit=1).

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Voir section 1 (Démarche Qualité).

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Le CNR ne réalise pas de PCR à visée diagnostic de première intention à partir d'échantillons cliniques. Ces tests sont effectués en pratique courante par les laboratoires d'analyses de biologie médicale.

Techniques d'identification du genre et de l'espèce

- **Bactériologie classique**

La culture est la seule technique qui est 100% spécifique et qui permet d'analyser l'évolution de la population des bordetelles. Nous recevons les isolats en provenance principalement des laboratoires du réseau RENACOQ et du Col.BVH. Nous utilisons le milieu Bordet-Gengou additionné de 15% de sang de cheval, avec ou sans céfalexine, ainsi que le milieu Reagan-Lowe (ou charbon) additionné de 10% de sang de cheval. Nous confirmons l'identification des isolats avec les techniques suivantes :

- Caractères macroscopiques par observation visuelle des cultures ;
- Caractères microscopiques par la réalisation d'un Gram ;
- Caractères biochimiques permettant de différencier les espèces du genre *Bordetella* (oxidase, urease, hémolyse)
- Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker Daltonics).

Lorsque la confirmation de l'identification de la bactérie est validée, une mise en conserve en *Saccharose Phosphate Glutamate/Bovine Serum Albumin* est faite pour assurer un stockage au froid à long terme.

- **PCR en temps réel (ou qPCR)**

La détection de l'ADN de *Bordetella* peut se faire directement à partir des prélèvements nasopharyngés de patients suspects de coqueluche. Les différentes PCR en temps réel réalisées sont celles ayant comme cible :

- La séquence d'insertion IS481 (**technique du CNR accréditée**) qui permet la détection de l'espèce *B. pertussis* avec une grande sensibilité du fait de la présence d'un grand nombre de copies du gène ciblé dans son génome (près de 250). La spécificité n'est pas totale car on retrouve aussi l'IS481 dans le génome de l'espèce *B. holmesii* et de certaines *B. bronchiseptica* ;
- La séquence d'insertion IS1001 (**technique du CNR accréditée**) qui permet la détection de l'espèce *B. parapertussis* avec une bonne sensibilité du fait de la présence d'une vingtaine de copies du gène ciblé dans son génome. Cependant la séquence IS1001 est présente dans le génome de certaines *B. bronchiseptica* ;
- La séquence d'insertion h-IS1001 qui est spécifique de l'espèce *B. holmesii* ;

- La région promotrice de la toxine de pertussis (*ptxA-Pr*) qui est spécifique de l'espèce *B. pertussis* mais dont la détection est beaucoup moins sensible (seulement 1 copie par génome) que celle de l'IS481 ;
- La séquence en amont du gène de la flagelline *flaA* (PCR FLA) en duplex qui détecte spécifiquement l'espèce *B. parapertussis* (2 cibles positives) et qui permet de différencier cette espèce de l'espèce *B. bronchiseptica* (1 seule cible positive) ;
- Le gène BP3385 qui est spécifique de l'espèce *B. pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle qui cible l'IS481. Toutefois, il peut détecter aussi l'espèce *B. bronchiseptica* dans de rares cas ; et c'est pourquoi la PCR FLA est faite en parallèle de cette PCR.

Les qPCR IS481 et IS1001 sont remboursées par la sécurité sociale depuis mars 2011 pour le diagnostic moléculaire de la coqueluche en laboratoire de biologie médicale de ville ou hospitalier.

Détermination de la sensibilité aux anti-infectieux

Pour les isolats cliniques envoyés ou isolés au CNRCOQ, la sensibilité aux anti-infectieux (ampicilline, céfalexine, streptomycine, érythromycine, azithromycine, clarithromycine, triméthoprim/sulfaméthoxazole = cotrimoxazole) est testée par la méthode de diffusion en gélose à partir de disques (BIO-RAD). Les antibiotiques clarithromycine et azithromycine ainsi que le cotrimoxazole (alternative en cas de contre-indication des 2 premiers antibiotiques) sont ceux recommandés en prophylaxie lors de contacts avec un cas ou lors de cas groupés de coqueluche.

Concernant les macrolides (érythromycine, azithromycine et clarithromycine), qui sont utilisés en thérapie, un seul isolat (2011) de *B. pertussis* a été trouvé résistant depuis la création du CNR en 1993 (Guillot et al., EID, 2012). Tous les isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* présentent une résistance naturelle in vitro à la céfalexine.

Techniques de typage et de caractérisation des isolats cliniques

- **Génotypage par séquençage génomique (cgMLST)**

Le génotypage des souches des *Bordetella* se fait depuis 2018 à l'aide du séquençage à haut débit (technologie Illumina) par l'analyse du core génome (cgMLST) défini au CNR (cgMLST *B. pertussis* - Bouchez et al., EID 2018 ; cgMLST *Bordetella* genre - Bridel, Bouchez et al., Nat Commun 2022) disponible dans la plateforme BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>).

- **Génotypage des gènes d'antigènes vaccinaux**

La détermination de la séquence allélique des gènes d'intérêt ciblés par le vaccin coquelucheux (et du promoteur de la toxine de pertussis) se fait depuis 2016 par séquençage à haut débit (technologie Illumina). Les séquences des gènes d'intérêt sont extraites et comparées à celles des souches de référence et des souches vaccinales à l'aide de la plateforme bio-informatique BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>).

- **Vérification de l'absence de la mutation qui induit la résistance aux macrolides**

Le CNR réalise désormais la vérification de l'absence de la mutation dans le 23S RNA qui induit la résistance aux macrolides directement à partir des données de séquençage Illumina, via la plateforme BIGSdb.

- **Vérification de la production des protéines vaccinales déterminants de virulence**
 - Avec des anticorps monoclonaux spécifiques, par agglutination et/ou immunofluorescence pour les protéines fimbriales (FIM2/FIM3) ;
 - Avec des anticorps polyclonaux spécifiques, par immuno-empreinte, pour la toxine de pertussis (PT), l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) et la pertactine (PRN).

Technique de sérologie abandonnée en routine

Il s'agit du dosage des anticorps dans le sérum de personnes afin de détecter celles qui ont été infectées ou vaccinées. Seul le dosage des anticorps anti-toxine de pertussis (anti-PT) est considéré spécifique mais il peut être dû à une infection récente à *B. pertussis*, mais aussi à une vaccination. La sérologie n'a plus d'indication diagnostique car cette méthode est considérée d'interprétation trop incertaine. Elle n'est plus remboursée par la sécurité sociale depuis 2011.

Le CNR effectuait la sérologie en utilisant une méthode ELISA (trousse commerciale validée lors d'une étude collaborative qui a été publiée en 2014 (Dinu et al., DMID 2014). Le CNR n'effectue plus cette technique en routine depuis 2017.

Mise en culture d'un prélèvement respiratoire

La culture permet de caractériser les souches circulantes de *Bordetella* et de suivre l'évolution de la population bactérienne de *Bordetella*, et présente donc un intérêt épidémiologique majeur. Le diagnostic de *Bordetella* par culture est peu pratiqué en France, mais il peut être réalisé par le CNR, non pas en diagnostic de première intention, mais pour la confirmation de l'identification, le séquençage génomique, le typage et l'antibiogramme.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Techniques d'identification du genre et de l'espèce (bactériologie classique et PCR en temps réel) ; détermination de la sensibilité aux anti-infectieux ; génotypage par séquençage génomique (cgMLST), génotypage des gènes d'antigènes vaccinaux ; vérification de l'absence de la mutation qui induit la résistance aux macrolides et mise en culture de *Bordetella* (voir ci-dessus pour plus de détails).

3. ANNEXE 3 : Déclaration publique d'intérêt du responsable (Sylvain BRISSE)

Disponible sur : <https://dpi.sante.gouv.fr>