

**Rapport annuel d'activité**

**2018**

**Centre National de Référence de la  
coqueluche et autres bordetelloses**

**Année d'exercice  
2017**



## TABLE DES MATIERES

<b>1 Missions et organisation du CNR .....</b>	<b>6</b>
<b>2 Activités d'expertise.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Évolutions des techniques .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Collection de matériel biologique .....</b>	<b>7</b>
<b>2.5 Présentation des activités d'expertise de l'année 2017 .....</b>	<b>7</b>
2.5.1 Nature des échantillons biologiques reçus au CNR .....	7
2.5.2 Nombre d'échantillons cliniques reçus au CNR en 2017 .....	8
2.5.3 Niveau de caractérisation des isolats cliniques .....	10
2.5.4 Nombre de PCR et de sérologies réalisées en 2017 .....	10
2.5.4 Informations complémentaires en provenance du laboratoire CERBA.....	11
2.5.5 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux.....	11
<b>2.6 Activités de séquençage .....</b>	<b>12</b>
<b>3 Activités de surveillance.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections .....</b>	<b>14</b>
3.1.1 Surveillance de la coqueluche .....	14
3.1.2 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche.....	17
<b>3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Participation aux réseaux de surveillance .....</b>	<b>19</b>
3.3.1 Europe .....	19
3.3.2 Autre international.....	19
<b>3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance .....</b>	<b>20</b>
<b>4 Alerte .....</b>	<b>20</b>
<b>5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé .....</b>	<b>21</b>
<b>6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....</b>	<b>22</b>
<b>6.1 Description des activités de recherche en cours notamment uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR. ....</b>	<b>22</b>
<b>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 .....</b>	<b>23</b>
6.2.1 Publications internationales .....	23
6.2.2 Communications internationales (invitées).....	23
6.2.3 Communications nationales (invitées) .....	23
<b>7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....</b>	<b>23</b>
<b>8 Programme d'activité pour les années suivantes (N+1 et N+2) .....</b>	<b>23</b>
<b>Annexe 1 : Missions &amp; organisation du CNR.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2 Organisation du CNR .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Locaux et équipements .....</b>	<b>26</b>
<b>1.4 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Description de la démarche qualité du laboratoire .....</b>	<b>28</b>
<b>Annexe 2 : Capacités techniques du CNR .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR .....</b>	<b>31</b>

## Liste des abréviations/acronymes

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ANP</b>	Aspiration naso-pharyngée
<b>ARS</b>	Agence Régionale de Santé
<b>BGS</b>	Bordet Gengou au sang
<b>Col.BVH</b>	Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux de France
<b>CgMLST</b>	Core Genome Multi Locus Sequence Typing
<b>CQ</b>	Contrôle Qualité
<b>Ct</b>	"Cycle Threshold" ou Cycle seuil
<b>ECDC</b>	European Center for Disease Prevention and Control
<b>ECP</b>	Electrophorèse en champs pulsé (PFGE est l'acronyme anglais)
<b>EQA/EEQ</b>	External Quality Assessment - Essai externe de la Qualité
<b>HCSP</b>	Haut Comité de Santé Publique
<b>LABM</b>	Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale
<b>LREMS</b>	Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site
<b>MALDI-TOF</b>	Spectromètre de masse à temps de vol (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight)
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (qui signifie amplification en chaîne par polymerase)
<b>qPCR</b>	Amplification en chaîne par polymerase en temps réel (ou quantitative)
<b>RENACOQ</b>	REseau National de la COQueluche
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism (mutation ponctuelle : polymorphisme nucléotidique simple)
<b>SMQ</b>	Système de Management de la Qualité
<b>SpF</b>	Santé publique France
<b>SPG/BSA</b>	Saccharose Phosphate Glutamate/Bovine Serum Albumine

## Résumé analytique

La coqueluche reste un défi de santé publique important en France comme partout dans le monde. Le Centre National de Référence (CNR) a pour mission principale de contribuer au volet microbiologique de la surveillance de cette infection en France. En 2017, le nombre d'isolats reçus au CNR reste faible, reflétant probablement une situation de creux entre deux cycles épidémiques. De plus, la proportion d'isolats de *Bordetella pertussis* qui ne produit pas la pertactine, continue d'augmenter légèrement (49% en 2016, 52% en 2017). Les autres caractéristiques des souches restent stables.

## Analytical Summary

Pertussis remains a major public health challenge in France and around the world. The main mission of the National Reference Centre (NRC) is to contribute to the microbiological component of the surveillance of this infection in France. In 2017, the number of isolates received by the NRC remains low, possibly corresponding to a gap between two epidemic cycles. In addition, the proportion of *Bordetella pertussis* isolates that do not express pertactin continues to increase (49% in 2016, 52% in 2017). The other characteristics of the strains remain stable.

## Introduction

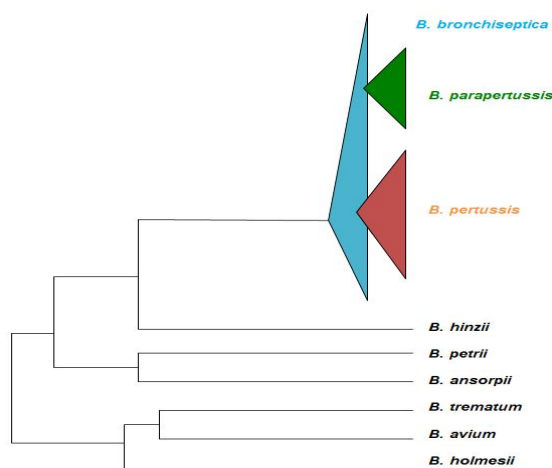
Les bordetelles sont divisées en plusieurs espèces (Figure 1) : *B. avium* et *B. hinzii*, qui infectent principalement les oiseaux sauvages et volailles; *B. ansorpii* et *B. trematum*, qui infectent l'homme de manière anecdotique ; et quatre espèces qui infectent l'homme plus fréquemment. Celles-ci sont notamment *B. pertussis* et *B. parapertussis*, les agents de la coqueluche; mais aussi *B. holmesii*, agent de bactériémies chez les sujets immunodéprimés, en particulier aspléniques, et pouvant aussi être détecté lors d'un syndrome coqueluchoïde; et *B. bronchiseptica*, qui peut infecter plusieurs espèces de mammifères et induire chez l'homme immunodéprimé des bactériémies ou des infections respiratoires. Enfin, *B. petrii*, bactérie de l'environnement qui peut induire, bien que rarement, une infection respiratoire persistante chez l'homme.

De nouvelles espèces de *Bordetella*, peu fréquentes, ont été récemment identifiées et ne sont pas représentées dans la Figure 1. Elles ont été collectées :

- ✓ Chez l'homme (Vandamme et al, Int J Syst Evol Microbiol. 2015; 65 (10)) : *Bordetella bronchialis*, *Bordetella sputigena*, *Bordetella flabilis*
- ✓ Chez des souris de laboratoire (Ivanov et al, Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66(12):5452-5459) : *Bordetella pseudohinzii*
- ✓ Sur une tapisserie de plus de 1300 ans (Tazato et al, Int J Syst Evol Microbiol. 2015 Dec;65(12):4830-8) : *Bordetella muralis*, *Bordetella tumulicola* et *Bordetella tumbae*.

### Figure 1. Modèle des relations phylogénétiques des espèces du genre *Bordetella*.

*B. pertussis* et *B. parapertussis* ont évolué à partir de lignées appartenant à l'espèce *B. bronchiseptica*



Les facteurs de virulence exprimés par les trois espèces classiques du genre *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*) sont classés en (i) adhésines, qui permettent l'adhésion de la bactérie sur les cellules de l'hôte, et (ii) toxines, qui induisent des effets cytopathogènes.

Les principales adhésines sont l'hémagglutinine filamenteuse FHA, les protéines fimbriales Fim2 et Fim3 et la pertactine PRN. Les principales toxines sont :

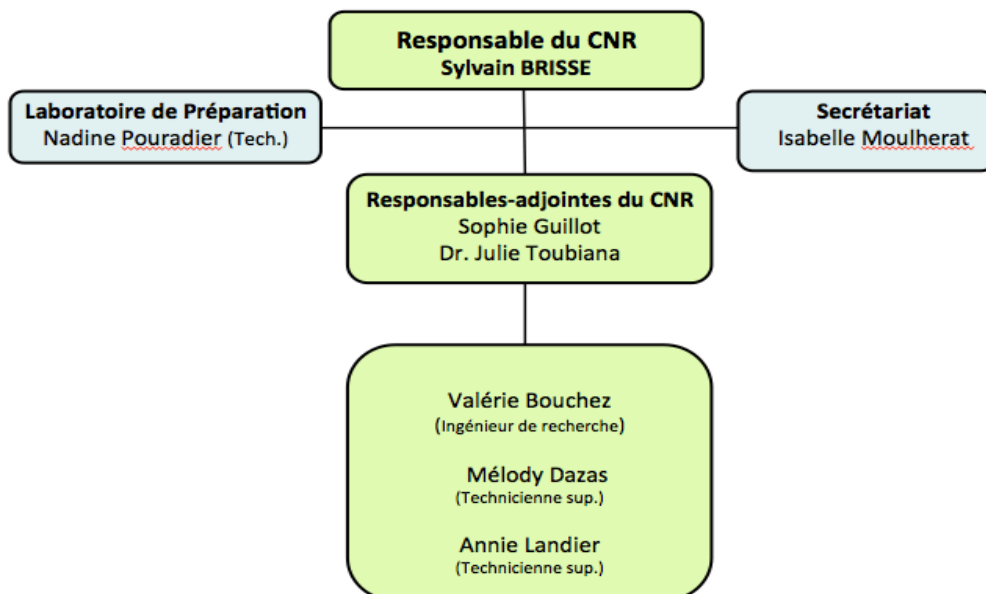
- la toxine de pertussis PT, toxine ADP-ribosylante, produite seulement par *B. pertussis*
- l'adényl cyclase-hémolysine AC-Hly, toxine RTX,
- la toxine BteA (effecteur du système de sécrétion III),
- la toxine dermonécrotique TDN, et la toxine cytotrachéale TCT.

Seule la toxine PT et les adhésines FHA, PRN, Fim2 et Fim3 entrent dans la composition de vaccins sous-unitaires. Une évolution des populations de *B. pertussis* vers un échappement à la pression exercée par l'immunité vaccinale a été mise en évidence par de nombreux travaux, dont ceux du CNR. Cette évolution se traduit par une divergence antigénique par rapport aux variants des antigènes utilisés dans les vaccins, ou par la perte d'expression de certains antigènes (notamment PRN). Il est donc important de surveiller ce phénomène, qui impacte potentiellement l'efficacité vaccinale.

## 1 Missions et organisation du CNR

Le CNR est hébergé au sein de l'unité de recherche « Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes » (BEBP) de l'Institut Pasteur, créée en Juillet 2017 et placée sous la responsabilité de Sylvain Brisse. Cette équipe assure seule les missions de CNR : il n'y a pas de laboratoire associé.

L'organigramme de l'équipe du Centre National de Référence (CNR) est présenté ci-dessous :



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

## 2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est présentée en **Annexe 2**.

### Éléments clés de l'expertise en 2017 :

Nous poursuivons notre expertise microbiologique dans le cadre de la surveillance de la coqueluche en France et en Europe (réseau RENACOQ, PERTINENT). Une extension dans le cadre du réseau SENTINELLES se met en place.

En 2017, nous avons fourni une expertise et un transfert de technologie dans le cadre de la recrudescence de la coqueluche à Mayotte et à Bangui (République Centrafricaine).

### 2.1 Évolutions des techniques

En 2017 nous avons validé l'approche de génotypage par Core Genome Multi Locus Sequence Typing (cgMLST), qui est basée sur la variation de séquence nucléique de 2038 gènes présents dans la majorité des souches de l'espèce *B. pertussis*. Nous avons montré que cette approche permet de déterminer avec une bonne probabilité, l'appartenance de souches à la même chaîne de transmission (cas groupés familiaux). Nous avons mis en place un site web dédié à la comparaison internationale des souches par cette approche :

<http://bigsd.b.pasteur.fr/bordetella/bordetella.html>. Ces travaux font l'objet d'une publication acceptée dans Emerging Infectious Diseases, qui sera publiée dans le numéro de juin 2018 de ce journal.

Depuis 2017, le génotypage des facteurs de virulence est réalisé par analyse des séquences génomiques générées par la technologie Illumina, en remplacement des approches PCR en point final et du séquençage Sanger précédemment employées.

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

Contrôle qualité qPCR organisé par le CNR:

Comme en 2012, nous avons proposé en 2016 aux correspondants du CNR un contrôle qualité pour le diagnostic des infections à *Bordetella* par PCR en temps réel (qPCR). Trente-deux laboratoires du réseau RENACOQ et quelques laboratoires du Col.BVH ou de LABM volontaires ont accepté de participer à ce contrôle qualité. La liste des laboratoires réalisant ces contrôles qualités avec le CNR est disponible sur le site web du CNR (<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses>). La compilation des résultats a été envoyée à l'ensemble des participants en janvier 2017.

## 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

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

En 2017, nous avons collaboré avec les laboratoires du CHU de Mayotte et de l'Institut Pasteur de Bangui (RCA) pour la mise en place de nos qPCR diagnostiques (cibles: IS481 et IS1001) et d'identification spécifique de l'espèce de *Bordetella pertussis* (cible : *ptxA-Pr*).

## 2.4 Collection de matériel biologique

En 2017, nous avons mis en collection 91 isolats cliniques, décrits dans la section 2.5.2.

Distribution de souches : néant (aucune demande).

Distribution d'ADN : nous avons envoyé des ADN (contrôles positifs) à Mayotte et à Bangui.

## 2.5 Présentation des activités d'expertise de l'année 2017

### 2.5.1 Nature des échantillons biologiques reçus au CNR

Les échantillons biologiques reçus pour expertise par le CNR comprennent des isolats cliniques et des prélèvements biologiques (aspirations ou écouvillons naso-pharyngés, expectorations, sérums, ADN extraits de prélèvements respiratoires) qui proviennent essentiellement de :

- ✓ patients infectés par *B. pertussis* hospitalisés et dont les échantillons sont envoyés par les cliniciens participant au réseau RENACOQ ;
- ✓ patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (par exemple crèche, établissements scolaires, collectivités type EHPAD) ;

- ✓ patients ou animaux infectés par *B. bronchiseptica* ou par d'autres espèces de Bordetelles et envoyées, le plus souvent, par les bactériologistes du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux Généraux de France ;

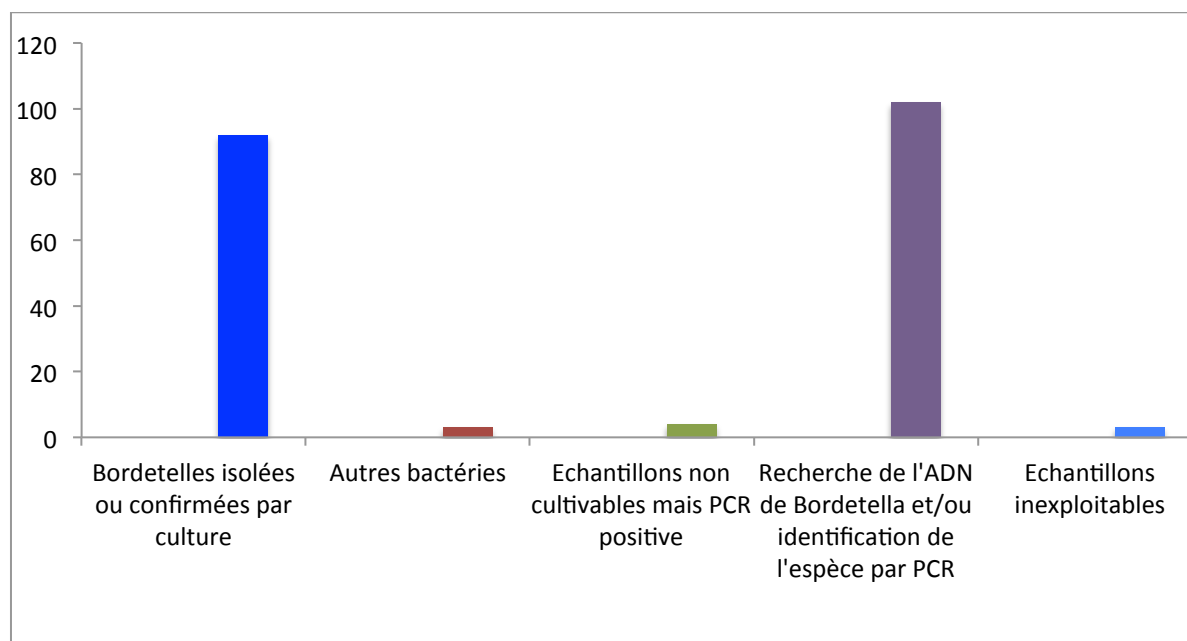
Par ailleurs, l'unité de recherche reçoit des prélèvements dans le cadre de la surveillance organisée via le réseau ACTIV (qui ne sont pas comptabilisés dans les tableaux et figures de ce rapport).

### 2.5.2 Nombre d'échantillons cliniques reçus au CNR en 2017

En 2017, nous avons reçu 92 isolats du genre *Bordetella*, 3 isolats d'un autre genre bactérien, 4 prélèvements non cultivables mais qui ont pu être identifiés comme *Bordetella* par PCR, 95 prélèvements ou ADN extraits sur lesquels une PCR a été réalisée pour vérifier la présence de l'ADN de *Bordetella* et/ou identifier l'espèce de *Bordetella*. Parmi ceux-ci, figurent notamment des échantillons reçus dans le cadre du projet PERTINENT (voir section 3.3.1).

Parmi les 102 prélèvements ou ADN extraits analysés, nous avons obtenu 56 PCR positives à *Bordetella pertussis*, 1 PCR positive à *Bordetella parapertussis*, 2 PCR positives à *Bordetella pertussis* et *parapertussis*, 2 PCR positives à *Bordetella holmesii*, 1 PCR positive à *Bordetella bronchiseptica* et 15 PCR positives à *Bordetella*. Nous avons également reçu 3 prélèvements inexploitable. La répartition des échantillons reçus et analysés au CNR est présentée dans la **Figure 2**.

**Figure 2. Répartition des échantillons cliniques reçus et analysés au CNR en 2017**



Les isolats cliniques reçus ou isolés au CNR en 2017 ont été identifiés et les espèces auxquelles ils appartiennent sont présentées dans le **Tableau** ci-après.



**Tableau 1 : Nombre d'isolats cliniques reçus ou isolés au CNR en 2017**

Source	Espèces	2017
RENACOQ		
	<b><i>B. pertussis</i></b>	<b>59</b>
	<i>B. parapertussis</i>	2
HORS RENACOQ (dont Col.BVH)		
	<b><i>B. pertussis</i></b>	<b>7</b>
	<i>B. parapertussis</i>	0
	<i>B. bronchiseptica</i>	8
	<i>B. hinzii</i>	2
	<i>B. holmesii</i>	5
	<i>B. petrii</i>	3
	<i>B. trematum</i>	5
LABM		
	<i>B. bronchiseptica</i>	1
<b>Total</b>		<b>92</b>

Les résultats des caractérisations sont résumés ci-dessous.

- *B. pertussis* et *B. parapertussis* :

- 66 isolats de *B. pertussis* (dont un doublon fratrie soit **65 souches**) pour lesquels 89% ont été envoyés par les bactériologistes du réseau RENACOQ. Les autres souches cliniques ont été envoyées par les hôpitaux de Poitiers (x6) et d'Annecy (x1).
- Nous avons reçu 2 isolats de *B. parapertussis* en provenance du réseau Renacoq.

- Autres espèces du genre *Bordetella* :

- Les isolats reçus ont été la plupart en provenance du collège de Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux de France:
  - 9 isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine en provenance des hôpitaux d'Alençon, de Cholet, du Mans, de Lyon (x2), de Metz, de Nantes, de l'hôpital parisien St Antoine et également en provenance d'un LABM de la villes de Yerres;
  - 2 isolats de *B. hinzii* en provenance des hôpitaux de Longjumeau et d'Orléans
  - 5 isolats de *B. holmesii* en provenance des hôpitaux de Jossigny, de Lyon, de Lille et des hôpitaux parisiens Robert Debré et Bichat ;
  - 3 isolats de *B. petrii* den provenance de l'hôpital intercommunal de Créteil et des hôpitaux d'Amiens et de Nantes;
  - 5 isolats de *B. trematum* en provenance des hôpitaux d'Agen, d'Alençon, de Suresnes, de Tarbes et une clinique du Mans;

### 2.5.3 Niveau de caractérisation des isolats cliniques

- Vérification de la production par les isolats, des protéines impliquées dans la virulence et présentes dans les vaccins sous unitaires (pertactine, toxine de pertussis, hémagglutinine filamenteuse) par immuno-empreinte ;
- Sérotypie des protéines fimbriales (FIM2, FIM3) par agglutination et, le cas échéant, par immunofluorescence ;
- Génotypage des gènes qui codent pour la pertactine (*prn*), pour la sous-unité 1 de la toxine de pertussis (*ptxA*), ainsi que de la région promotrice de la toxine pertussis (*ptxP*), et pour les protéines fimbriales (*fim2* et *fim3*);
- Typage des isolats par séquençage génomique.

### 2.5.4 Nombre de PCR et de sérologies réalisées en 2017

- Le nombre de PCR réalisées par le CNR en 2017 est présenté dans le **Tableau 2**. Celles-ci ont été réalisées principalement dans le cadre de la surveillance RENACOQ dont l'étude PERTINENT, la demande des ARS (notamment lors de cas groupés de coqueluche dans une école), et dans le cadre du contrôle qualité externe EQA (QCMD BPDNA2017).

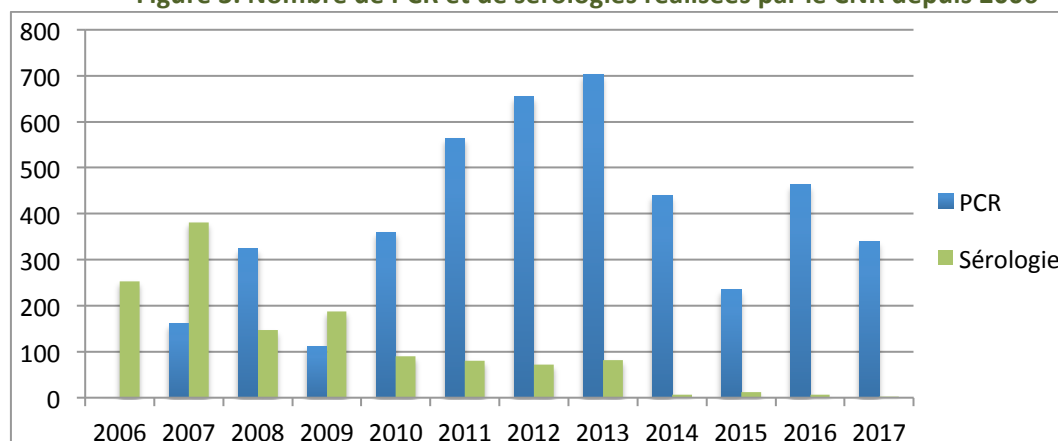
**Tableau 2 : Nombres de PCR réalisées en 2017**

Type de PCR	2017
Surveillance Renacoq dont l'étude PERTINENT	263
Cas groupés	34
EQA	43
Total	340

- Le nombre de sérologies réalisées dans le cadre de la surveillance des bordetelloses est de trois. Une sérologie a été faite à la demande du médecin d'un EPHAD pour une personne qui travaille au sein de l'établissement et qui toussait depuis plus de trois semaines. Les deux autres sérologies ont été réalisées à la demande de l'ARS PACA à la suite de cas de coqueluche dans le service d'un CH (voir section ALERTE 4 2)).

- La **Figure 3** montre l'évolution du nombre de PCR et sérologies réalisées par année de 2006 à 2017. On observe que le nombre de sérologies demandées au CNR a très nettement diminué depuis 2014. Cette évolution est en accord avec les recommandations du HCSP ([http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/hcspr20140710\\_conduitenircascoqueluche.pdf](http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/hcspr20140710_conduitenircascoqueluche.pdf)).

**Figure 3. Nombre de PCR et de sérologies réalisées par le CNR depuis 2006**



## 2.5.4 Informations complémentaires en provenance du laboratoire CERBA

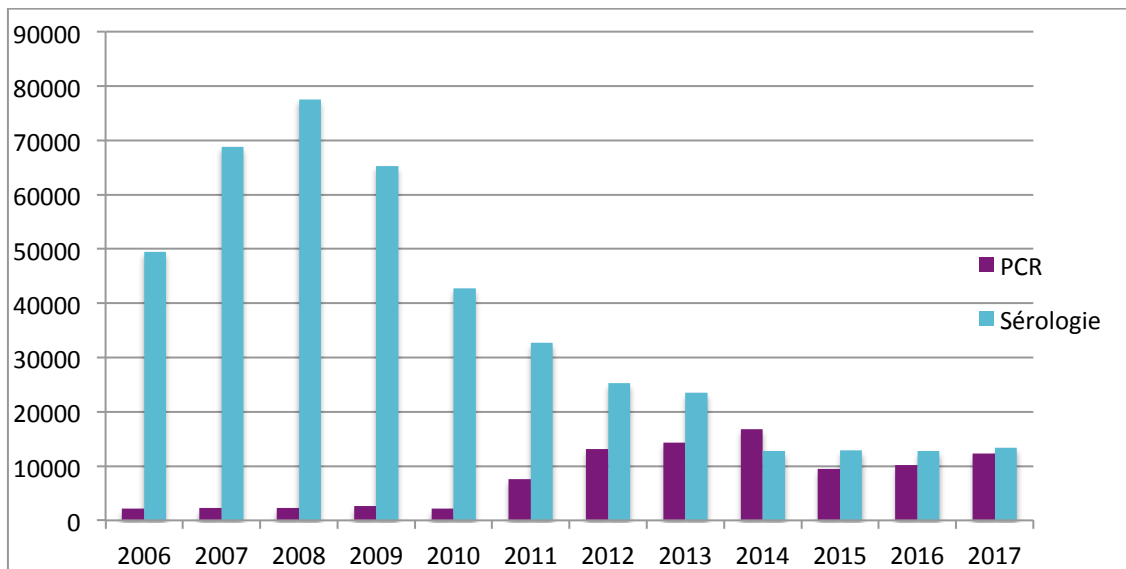
A notre demande, nous recevons chaque année du laboratoire CERBA le nombre annuel de sérologies et de PCR réalisées (et le nombre de résultats positifs). Ces données contribuent à suivre l'évolution de l'utilisation des diagnostics biologiques en France et à la surveillance.

Le nombre de PCR réalisées par ce laboratoire en 2017 est de 12 266 ; il a légèrement augmenté par rapport à 2016 ( $n=10\ 147$ ) (**Figure 4**). Sur ces 12 266 PCR, 14,3% ont été positives pour le genre *Bordetella*, contre 7% en 2016. Le pourcentage de PCR positives observé en 2017 est le reflet de ce qui a été observé dans certaines régions françaises à partir du mois de mars avec une augmentation du nombre de PCR positives et ce jusqu'en juin 2017 qui est le mois de l'année pendant lequel la proportion de PCR positives a été la plus élevée (voir section 3.4, **Figure 8**). Au cours des 3 derniers mois de l'année, le pourcentage de PCR positives est redescendu à 7%.

Les demandes de sérologies adressées au laboratoire CERBA sont de 13 422 en 2017. La proportion de sérologies positives a augmenté pendant la période d'été 2017, reflétant ce qui a été observé avec le diagnostic direct par PCR. Depuis 2014, le nombre de sérologies est stable et il fait suite aux recommandations du HCSP indiquant que la sérologie n'a plus sa place dans la stratégie diagnostique de la coqueluche en pratique courante.

(hcspr20140710\_conduitenircascoqueluche.pdf).

**Figure 4. Nombre de PCR et sérologies réalisées par le laboratoire CERBA, 2006-2017.**



## 2.5.5 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux

Tous les isolats reçus au CNR ont été testés vis-à-vis des macrolides, antibiotiques qui sont recommandés pour le traitement de la coqueluche ou dans le cadre d'une antibioprophylaxie lors de cas groupés de coqueluche.

## 2.6 Activités de séquençage

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

OUI, l'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à hauts débits multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina ; 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. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

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

Les CNR ont à l'heure actuelle la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), 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. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNR et les unités qui les hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié. Par ailleurs, le nombre d'ETP de bio-informaticiens affecté à la plateforme dédiée aux CNR fait l'objet d'une négociation interne annuelle.

En 2017, notre CNR a bénéficié de la collaboration de bioinformaticiens du C3BI pour la mise en place de la méthode de génotypage cgMLST et pour développer une approche de 'whole genome SNPs'.

### ✓ **Outils utilisés pour l'analyse des séquences : commercial (BioNumerics par exemple), outil open source, outil maison ...**

Nous utilisons une combinaison d'outils bioinformatiques en ligne de commande UNIX et en interface graphique. Les outils les plus utilisés sont la plateforme BIGSdb (pour le génotypage cgMLST), et BLASTN (extraction des gènes de virulence pour le génotypage).

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

OUI, nous surveillons les génotypes des souches (séquençage génomique puis extraction des informations en relation avec la perte de production de la pertactine, et génotypage des antigènes vaccinaux).

### ✓ **Si OUI, pour quelles activités :**

- Investigations d'épidémies ?

Nos méthodes de génotypage cgMLST nous permettent de tester l'hypothèse que certaines souches sont reliées épidémiologiquement (cas groupés).

- Surveillance ?

Nous génotypons les souches pour surveiller l'émergence de lignées particulières.

- Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, séro groupe/sérotype prédiction, résistome prédiction, analyse phylogénétique,...) et préciser si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquer alors lesquelles).

Typiquement, les séquences sont assemblées (logiciel SPAdes) puis l'allèle des 2038 gènes du schéma cgMLST est déterminé en utilisant notre base de données d'allèles sur l'application informatique BIGSdb ; une classification phylogénétique avec les séquences présentes dans la base de données des génomes peut ainsi être réalisée à la demande.

Nous déterminons également le statut intègre ou non du gène de la pertactine (PRN) et les allèles des antigènes impliqués dans les vaccins. Nous procédons à l'analyse génomique du gène de la pertactine, en particulier, pour comprendre les bases génétiques chez les isolats de *B. pertussis* ne produisant pas plus cet antigène. Plus précisément nous cherchons à identifier les modifications génomiques au sein du gène ou de sa séquence promotrice avec BLASTN. Pour cela, nous utilisons la séquence PRN de la souche de référence TOHAMA (numéro d'accèsion GenBank NC002929) : séquence du promoteur plus le gène (identifiant BP1054) qui est de type PRN1 ; et de l'isolat B1917 (numéro d'accèsion GenBank CP009751.1) de type PRN2. Nous constituons ainsi une base de données génomiques pour les isolats de *B. pertussis* PRN-.

- Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies : nombre de séquences réalisées dans l'année.

Les séquences du léger pic observé sur le printemps et l'été ont été réalisées pour s'assurer de l'absence d'émergence d'une lignée particulière. Les 31 isolats reçus entre mai et septembre 2017 ont été caractérisés et nous n'avons pas observé l'émergence d'une lignée distincte.

- Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :
  - Nombres de séquences réalisées dans l'année : 92
  - Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées : Aucune sélection - Séquençage exhaustif.
- Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastq files) :

A l'occasion de nos publications nous déposons les séquences au format fastq dans ENA et également dans notre plateforme BIGSdb publique (<http://bigbdb.pasteur.fr/bordetella/bordetella.html>). Nous déposons toutes les séquences dans notre plateforme BIGSdb privée.

### 3 Activités de surveillance

#### 3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En 2017, nous avons poursuivi nos collaborations avec :

- Santé Publique France et les 42 hôpitaux du réseau RENACOQ (Réseau hospitalier, initié en 1996 ; **Figure 5**). Le réseau RENACOQ représente environ 30% des cas de coqueluche vus à l'hôpital en France.

**Figure 5. Villes hébergeant des hôpitaux du réseau RENACOQ**



- Le Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des hôpitaux de France

En 2016, nous avons participé à la rédaction du protocole de surveillance des cas confirmés de coqueluche en population générale menée par le réseau Sentinelles, en partenariat avec SpF et le CNR. La surveillance a commencé en janvier 2017 et une réunion présentant les premiers résultats est prévue en mai 2018.

Au titre de l'unité de recherche, nous participons de plus :

- Au réseau ACTIV (Association Clinique et Thérapeutique Infantile du Val de Marne), réseau de 55 pédiatres en ambulatoire.

##### 3.1.1 Surveillance de la coqueluche

Afin de fournir une perspective historique, l'évolution du nombre d'isolats par espèce de *Bordetella* reçus ou isolés chaque année au CNR depuis 1995 est présentée dans les **Figures 6a** et **6b**.

En 2017, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et *B. parapertussis*. L'épidémiologie de la coqueluche évolue selon des cycles qui durent de 3 à 5 ans. Le dernier pic épidémique a eu lieu en France en 2012 – 2013 (**Figure 6a**).

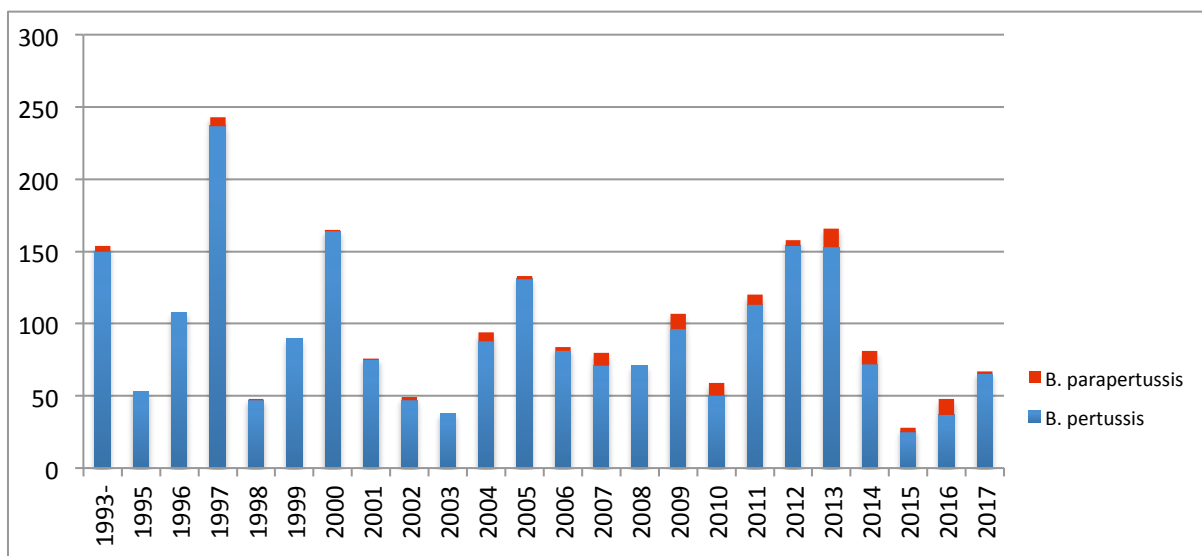
*B. pertussis* : Le nombre d'isolats de *B. pertussis* (n = 65, voir **Tableau 1**) reçu par le CNR en 2017 continue de légèrement augmenter par rapport à 2016, même s'il reste peu élevé par rapport au dernier pic épidémique (**Figure 6a**).

*B. parapertussis*, le second agent de la coqueluche, montre une incidence qui reste faible par comparaison avec celle de *B. pertussis*. Nous observons une nette diminution de la circulation des isolats de cette espèce en 2017 (**Figure 6a**). En 2017, seuls 2 isolats de *B. parapertussis* ont été reçus au CNR. Cependant, une des 2 souches a été isolée à partir d'une hémoculture effectuée chez une enfant de 3 ans originaire d'Algérie avec fièvre et notion de toux, hospitalisée dans un hôpital parisien. Il est très rare d'isoler une *Bordetella parapertussis* du sang et des investigations sont en cours pour caractériser la souche.

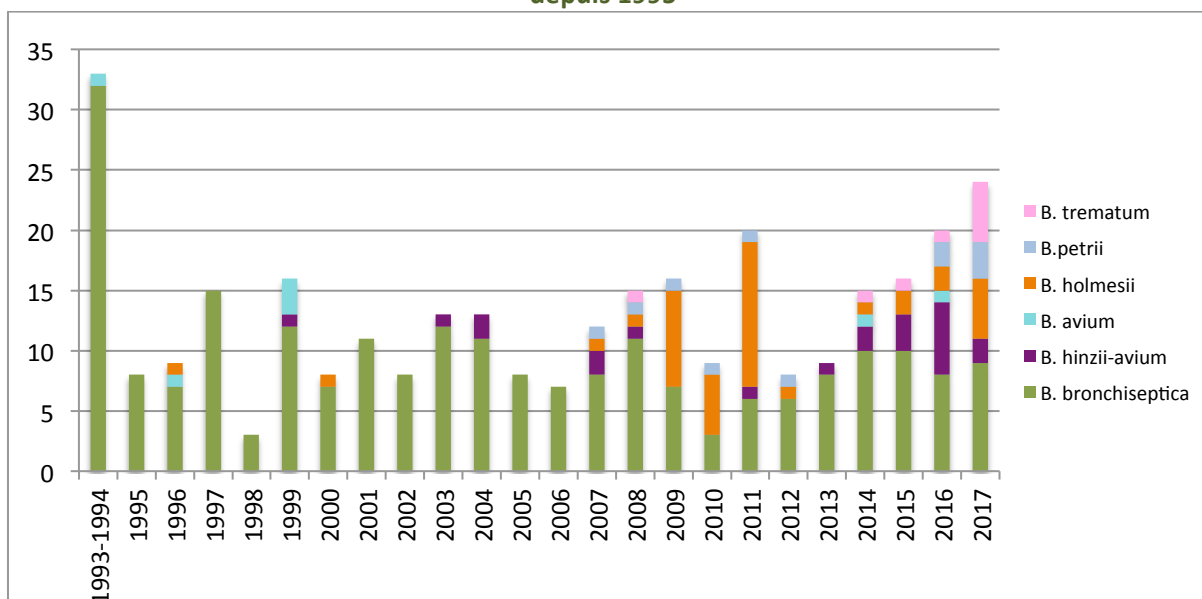
Tendances :

Ces résultats reflètent une situation de creux entre deux pics épidémiques de coqueluche et une légère augmentation du nombre d'isolats de *Bordetella pertussis* par rapport à 2016. Même s'il est trop tôt pour l'affirmer, cette augmentation préfigure peut-être le début d'un nouveau cycle épidémique.

**Figure 6a : Nombre d'isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus ou isolés au CNR depuis 1995**



**Figure 6b : Nombre d'isolats des autres espèces de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1995**



Répartition par classe d'âge : Comme lors des années précédentes, la proportion la plus élevée des isolats de *B. pertussis* est collectée chez des nouveau-nés âgés de moins de 6 mois (59%). Cette proportion fluctue légèrement (46% en 2016, 65% en 2015, 55% en 2014, 60% en 2013). De façon symétrique, la proportion des isolats collectés en 2017 (17%) chez les enfants âgés entre 2 et 8 ans a légèrement diminué par rapport à 2016 (22% en 2016; 4% en 2015 ; 12% en 2014 ; 12% en 2013).

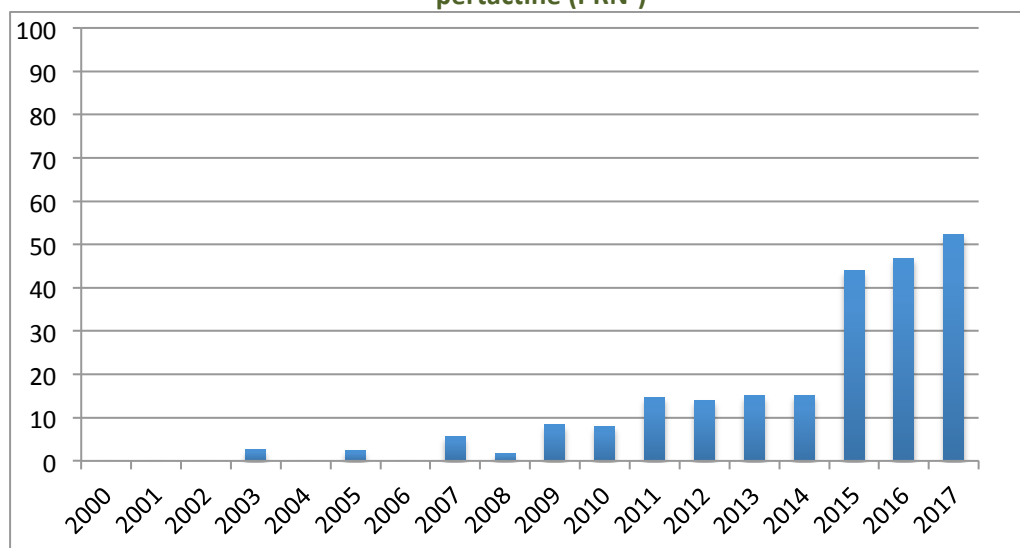
Surveillance de l'évolution des antigènes :

La surveillance des antigènes vise à caractériser une possible évolution des souches par divergence antigénique ou perte de l'expression des antigènes, sous pression de sélection induite par la vaccination des populations.

Les vaccins sous-unitaires utilisés en France sont soit bi-valents (PT + FHA ; PENTAVAC/TETRAVAC, HEXYON), tri-valent (PT, FHA, PRN ; INFANRIX, BOOSTRIX), soit penta-valents (PT + FHA + PRN + FIM2 + FIM3 ; REPEVAC). Le vaccin VAXELIS prochainement introduit en France inclut un vaccin contre la coqueluche de type pentavalent.

- **Pertactine**. Depuis 2007, des isolats de *B. pertussis* ne produisant plus l'antigène vaccinal pertactine (PRN) sont observés en France. En 2017, l'augmentation des isolats qui ne produisent pas PRN, se poursuit : de 15% en 2012-2013, la proportion d'isolats PRN- est passée en 2017 à 52,3% (**Figure 7**). La non production de la pertactine est due, pour plus de la moitié des isolats PRN-, à une inversion de séquence (22kb) au sein du promoteur de la pertactine. De multiples lignées PRN- ont évolué indépendamment et sont impliquées dans cette augmentation régulière de la proportion de souches PRN-. Concernant *B. parapertussis*, les 2 souches isolées en 2017 ne produisent pas la pertactine ; 99% des isolats de *B. parapertussis* circulant depuis 2007 ne produisent pas la PRN.

**Figure 7. Pourcentage des isolats de *B. pertussis* analysés qui ne produisent pas la pertactine (PRN-)**



- **Fimbriae de type 2 et 3** : les isolats de *B. pertussis* peuvent exprimer deux fimbriae différentes, le plus souvent de manière exclusive, ou parfois en combinaison. Les isolats de 2017 produisent majoritairement (69%) FIM3, une légère augmentation par rapport à 2016 (62%). La proportion des isolats qui produisent FIM2 en 2017 (22%) a légèrement diminué par rapport à 2016 (35%).



- **Allèles des gènes codant la toxine PT et la pertactine.** En 2017, l'allèle de la sous-unité S1 de la toxine de pertussis (PT) est pour la majorité des isolats de type *ptx1A* et celui de la PRN (pour les souches qui la produisent) est de type PRN2, comme la plupart des isolats circulant depuis 1990.

- **Allèles du promoteur de la toxine PT.** Le promoteur *ptxP* (situé en amont de l'opéron *ptx* codant les différentes sous-unités de la toxine de pertussis) montre une variation de séquence dont il a été suggéré 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 isolats possédant l'allèle *ptxP3* du promoteur de l'opéron codant la PT est observée. En 2017, tous les isolats sont de type *ptxP3* sauf un isolat (*ptxP1*).

- **Allèles de *Fim2* et *Fim3*** : tous les isolats de *B. pertussis*, sauf 2, portent l'allèle *fim2-1*. 64% des isolats de *B. pertussis* portent l'allèle *fim3-1* et le reste des isolats portent l'allèle *fim3-2*.

**En résumé, la proportion d'isolats cliniques de *B. pertussis* qui ne produisent pas l'antigène PRN continue son augmentation, tandis que les autres caractéristiques des souches sont stables.**

### 3.1.2 Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

#### ✓ Infections humaines à *B. bronchiseptica*

*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 2017, nous avons reçu 9 isolats de *B. bronchiseptica* au CNR, un nombre stable par rapport aux années précédentes (**Figure 6b**). Il s'agit principalement de cas d'infections chez des adultes dont la plupart sont immunodéprimés. Ils sont âgés de plus de 50 ans (les âges se répartissent entre 52 et 83 ans). Dans la majorité des cas, les patients ont été hospitalisés pour une infection pulmonaire chronique.

D'autre part, l'ADN d'une *Bordetella bronchiseptica* a été identifié par PCR spécifique d'espèce faite par notre CNR à partir du prélèvement respiratoire d'une patiente âgée de 9 mois. Le nourrisson avait été amené à l'hôpital pour une toux persistante de 3 semaines sans autre signe clinique après avoir été vu plusieurs fois par son médecin traitant et mis sous traitement antibiotique. Le laboratoire de biologie de l'hôpital nous a envoyé l'ADN positif en PCR avec la cible IS481 pour vérification de l'espèce de *Bordetella*. Alors que l'on s'attendait à identifier l'ADN d'une *B. pertussis*, il s'avère qu'il s'agissait de l'ADN d'une *Bordetella bronchiseptica* possédant le gène de la transposase IS481 dans son génome chromosomique. Ce résultat renforce l'importance de l'aide que le CNR peut apporter aux laboratoires demandeurs, lorsque la demande est justifiée, en réalisant une PCR spécifique qui permet de vérifier/confirmer l'espèce de *Bordetella* responsable de l'infection humaine.

#### ✓ Autres bordetelloses humaines

##### ***B. hinzii*** :

*Bordetella hinzii* est une espèce du genre *Bordetella* qui est impliquée dans les infections respiratoires chez les volailles. Quelques cas d'infection pulmonaire ou digestive et de bactériémies ont été décrits chez l'homme.

En 2017, nous avons reçu 2 souches de *B. hinzii* : une isolée d'une hémoculture chez un patient âgé de 68 ans qui a été hospitalisé pour une occlusion intestinale et une seconde souche isolée d'une expectoration chez un patient âgé de 73 ans qui a été hospitalisé pour insuffisance respiratoire.

***B. holmesii* :**

C'est une espèce du genre *Bordetella* qui a été décrite pour la première fois en 1995 par le CDC et qui est généralement décrite comme causant des bactériémies chez des patients immunodéprimés, notamment aspléniques ou drépanocytaires, mais elle peut aussi être occasionnellement isolée ou détectée, par PCR, à partir de prélèvements respiratoires chez des patients présentant des symptômes coqueluchoïdes.

En 2017, nous avons reçu 5 souches de *B. holmesii* isolées d'hémocultures chez des patient(e)s adolescents ou adultes (11, 19, 29, 62 et 64 ans).

- Les trois patients les plus jeunes sont drépanocytaires et ont été hospitalisés dans des hôpitaux d'Ile de France. Pour un des patients, âgé de 19 ans, nous avons mis en évidence la présence du matériel génétique de *B. holmesii* dans le prélèvement (expectoration) que nous avons demandé afin de vérifier si la bactérie était également présente dans le tractus respiratoire.

- La patiente âgée de 62 ans avait été admise dans un service d'infectiologie pour une spondylodiscite. Etant donné le contexte clinique, des investigations sont en cours pour caractériser la souche.

- Le patient âgé de 63 ans avait été admis à l'hôpital pour un érysipèle du membre inférieur, dont l'hémoculture avait été réalisée devant des frissons persistants et un antécédent de pathologie cardiaque.

***B. petrii* :**

*B. petrii* est une bactérie de l'environnement qui est décrite comme pouvant, bien que rarement, produire une infection respiratoire persistante chez l'homme.

Entre 2017, nous avons reçu 3 souches isolées chez des patients séniors (61, 71, 79 ans), tous hospitalisés pour une infection pulmonaire chronique. La bactérie a été isolée à partir d'un prélèvement respiratoire (expectoration ou lavage broncho alvéolaire) chez les trois patients.

***B. trematum* :**

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.

Entre 2017, nous avons reçu 5 souches isolées chez des patients adultes (42, 64, 68, 70, 90 ans) :

- Chez un patient âgé de 42 ans ayant une mucoviscidose, la souche a été isolée à partir d'une aspiration bronchique. Le patient avait précédemment eu une transplantation pulmonaire.

- La patiente, âgée de 64 ans, avait été hospitalisée en réanimation pour exacerbation d'une BPCO. La souche a été isolée à partir de l'extrémité d'un cathéter mis en culture.

- Une souche a été isolée à partir de la plaie d'ulcère chez un patient âgé de 68 ans et nous a été envoyée par un laboratoire de biologie médicale de ville.

- Chez la patiente âgée de 70 ans, la souche a été isolée à partir d'un écouvillon rectal. La bactérie a été trouvée fortuitement à la suite d'un programme de dépistage systématique d'un portage digestif de BMR dans le cadre de son hospitalisation en réanimation. Le portage digestif à *B. trematum* est peu connu et des investigations sont en cours, en collaboration avec notre collègue hospitalier.

- Enfin, une souche a été isolée d'une hémoculture d'une patiente âgée de 90 ans qui avait été hospitalisée pour ictère sur hépatopathie chronique.

## 3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Un isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides avait été isolé en 2011, pour la première fois en France et en Europe (Guillot S. et al. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. Emerg Infect Dis. 2012;18 (6):966-8). Depuis, nous n'avons pas observé de nouveau cas d'isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides en France, y compris en 2017. **Cependant, plusieurs isolats de *B. pertussis* résistants aux macrolides ont été trouvés en Chine ou en Iran. Il est important de surveiller l'émergence, l'introduction et la diffusion de telles souches en France.**

En 2017, comme c'était le cas les autres années, tous les isolats de *B. pertussis* présentaient une résistance naturelle à la céfalexine, *in vitro*. Il est important de surveiller la résistance des isolats à cet antibiotique car il est ajouté dans les milieux sélectifs pour la culture des Bordetelles.

Les 2 isolats de *B. parapertussis* de 2017 étaient résistants *in vitro* à la céfalexine, comme précédemment.

## 3.3 Participation aux réseaux de surveillance

### 3.3.1 Europe

Projet PERTINENT. Nous participons au projet Pertinent de surveillance de la coqueluche à l'échelle européenne qui a démarré en 2016 (en mars 2016 pour la France). Les objectifs du projet sont d'estimer le poids de la coqueluche chez les nourrissons hospitalisés âgés de moins d'un an, et d'estimer l'efficacité du vaccin coquelucheux contre l'hospitalisation des nourrissons. Nous avons organisé en 2016 un contrôle qualité des tests de diagnostic. Nous contribuons à la validation des données biologiques pour une vingtaine de centres hospitaliers français qui font partie du réseau RENACOQ et qui participent à Pertinent. En 2017, nous avons confirmé la présence de *B. pertussis* (par culture ou/et PCR spécifique selon le laboratoire) dans les échantillons envoyés au CNR.

Projet EUpertstrain. Nous continuons à participer au réseau européen de laboratoires de référence EUpertstrain. Dans ce cadre, nous échangeons des isolats cliniques et des modes opératoires. Nous nous réunissons une fois par an. Sylvain Brisse a fait une présentation des projets de génomique des populations en cours au CNR lors de la réunion qui a eu lieu à Oslo le 6 septembre 2017.

Réseau EUpertLab-Net. Nous participons au projet EUpert-LabNet, visant à coordonner un réseau de laboratoires de surveillance de la coqueluche 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. Cette étude est financée par le ECDC.

### 3.3.2 Autre international

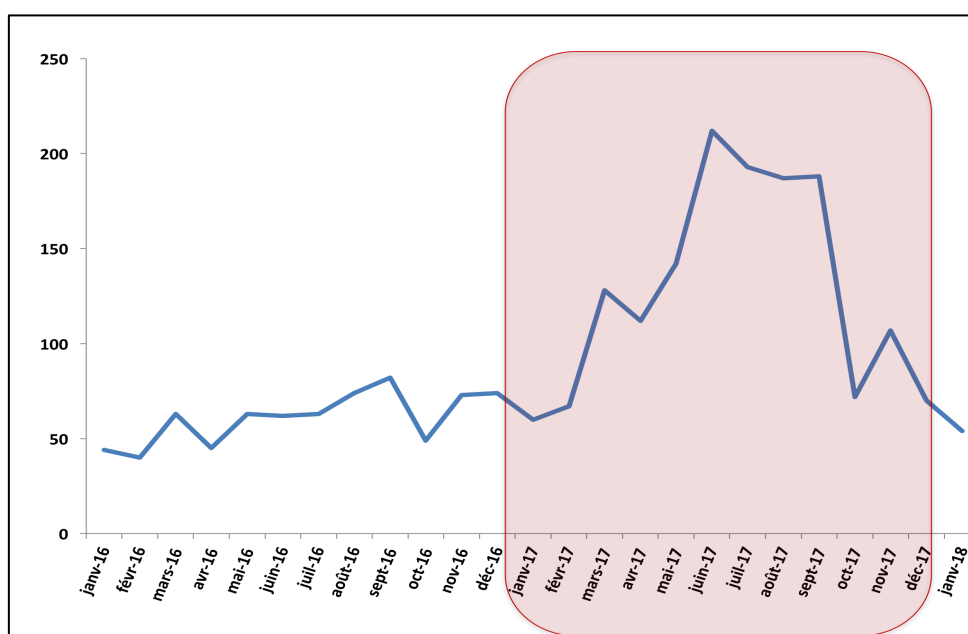
L'unité de recherche qui héberge le CNR, continue sa mission de formation internationale, avec une perspective d'application à la clinique, en s'appuyant en particulier sur des instituts Pasteur du Réseau international (RIIP). Ainsi, depuis 2016, l'Unité participe au projet **PERILIC** (PERTussis Immunization programs in Low and middle Income Countries), auquel se consacre Sandra Corre (Ingénieur), sous la Direction du Centre de Recherche Translationnelle (CRT) de l'Institut Pasteur et avec les conseils de Nicole Guiso. Les objectifs du projet sont d'assurer un transfert des méthodes de laboratoire et de surveillance dans différents pays (Cambodge, Iran, Madagascar et Togo) et d'obtenir des données épidémiologiques sur la coqueluche dans ces pays. Ce projet dont la durée prévue est de 3 ans, permettra d'améliorer les recommandations vaccinales dans ces pays en les adaptant à l'épidémiologie locale et au type de vaccin utilisé.

### 3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

La biologiste en charge du diagnostic de la coqueluche au sein du laboratoire CERBA a contacté le CNR début juillet 2017 pour l'informer d'une recrudescence des cas de coqueluche diagnostiqués par PCR. L'augmentation du nombre de PCR IS481 positives a été observée à partir du mois de mars 2017. L'analyse des données a montré que la proportion de PCR IS481 positives a continué à augmenter jusqu'en juin 2017 (**Figure 8**). Il est important de souligner que l'augmentation du nombre de PCR IS481 positives n'est pas la même dans les différentes régions françaises ; le nombre de PCR positives était 4 à 6 fois plus élevé en mars-juin 2017 comparé à mars-juin 2016 dans les régions PACA, Bretagne, Nouvelle Aquitaine, Bourgogne-Franche-Comté et Corse, mais équivalent dans la région Grand Est.

Fort de ces observations, le CNR a alerté SpF et une réunion a été organisée début décembre 2017 entre les membres du CNR et de SpF impliqués dans la surveillance de la coqueluche pour discuter des tendances observées au courant de l'année 2017.

**Figure 8. Nombre de PCR positives IS481 issus des données du laboratoire Cerba entre janvier 2016 et janvier 2018.**



## 4 Alerte

Lors de cas groupés de coqueluche, le CNR demande aux personnels médicaux concernés de prévenir SpF et les ARS. Le CNR envoie par courriel le calendrier vaccinal, l'avis 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 sont heureusement rares :

1) En 2017, à la demande de l'ARS, nous avons reçu des échantillons en provenance de cas groupés de coqueluche dans une école primaire des Deux-Sèvres. Le CNR a effectué les PCR de contrôle afin de vérifier l'espèce de *Bordetella* responsable de l'infection et a confirmé qu'il s'agissait de l'espèce *B. pertussis*.

2) En février 2017, nous avons reçu des échantillons en provenance d'un laboratoire de biologie de la région PACA suite au décès d'un nouveau-né survenu environ 2 semaines après sa sortie de la maternité d'un CH de la région. L'hôpital a procédé à un dépistage de la coqueluche parmi le personnel de la maternité en

faisant des PCR dont plusieurs se sont avérées positives. Le personnel de la maternité avait été en contact avec la mère qui toussait mais non traitée. Nous avons effectué des PCR de contrôle et des sérologies en étroite collaboration avec le laboratoire de biologie de l'hôpital et l'ARS PACA. Nous avons confirmé que la maman avait la coqueluche lorsqu'elle est venue pour accoucher à la maternité.

3) En novembre 2017, SpF (via la CIRE Océan Indien) a prévenu le CNR d'une recrudescence de cas de coqueluche à Mayotte. Sur les 57 cas suspects constatés depuis le début de l'année 2017, 10 cas confirmés ont été rapportés chez des nourrissons de moins de 1 an hospitalisés, incluant 1 décès chez un prématuré de 32 semaines. Le laboratoire de biologie médicale du CH de Mamoudzou (CHM) sous-traite la PCR pour le diagnostic moléculaire de la coqueluche au laboratoire CERBA situé dans la région parisienne. L'envoi des échantillons en métropole prend du temps et le laboratoire du CHM ne reçoit pas les résultats avant plusieurs jours (10 jours en moyenne), ce qui peut être dommageable en cas de situation d'urgence. A la demande de l'ARS Océan Indien, nous avons pris contact avec le laboratoire de biologie médicale du CHM afin de l'aider à mettre en place la PCR coqueluche en leur transférant notre technique de référence. Nous avons donc envoyé les modes opératoires et des ADN (contrôles positifs de référence) afin de valider la PCR.

4) Comme mentionné dans la section 3.4, le CNR a alerté SpF de l'augmentation inquiétante du nombre de PCR coqueluche positives à partir de mars 2017 dans plusieurs régions françaises. Les données ont été fournies par le laboratoire CERBA et analysées par notre CNR afin de suivre les tendances (**Figure 8**). Il a été convenu de continuer à collaborer étroitement avec le laboratoire CERBA afin de suivre l'évolution de la proportion des PCR positives dans les prochains mois.

## 5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

### 5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

- *Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé ;*

Cours par Sophie Guillot, dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-Sud à la faculté de Chatenay-Malabry : "**B. pertussis et les vaccins coquelucheux**" - le 15 novembre-2017 (3 heures).

Sylvain Brisse a donné un séminaire lors du colloque « Vaccination in the extreme ages of life » du réseau français de vaccinologie COREVAC le 12 décembre 2017.

Julie Toubiana intervient régulièrement dans le cadre de cours de 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> cycle des études médicales sur la thématique générale des maladies infectieuses pédiatriques, une partie en 2017 était dédiée à la sensibilisation des futurs médecins, pédiatres et infectiologues à la coqueluche, aux formes graves du nourrisson et aux recommandations HCSP de pratique autour d'un cas.

- *Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) ;*

Sophie Guillot : Co-auteur du Chapitre 53 de la nouvelle Version (V6) du Rémic, référentiel en microbiologie médicale (groupe Rémic de la Société Française de Microbiologie).

- *Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :*
  - *Rétro-information aux partenaires ;*
  - *Information/formation des professionnels de santé : mentionner notamment le **site internet** (adresse, date de création, rythme des actualisations, date du dernier rapport annuel d'activité mis en ligne) ;*

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 : 01/03/2018) : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses>.

Le dernier rapport annuel d'activité (année d'exercice 2016) est en ligne sur le site web du CNR.

- *Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités (si ces données sont disponibles), ...*

Le CNR peut être joint par téléphone, aux heures ouvrables, au poste du responsable, de l'adjointe et du secrétariat. Le CNR peut également être joint par courriel et un numéro de portable est disponible en cas d'urgence. Ces informations de contact sont disponibles sur le site web du CNR. En 2017, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel.

#### **Sollicitations par téléphone ou par courriel en 2017**

Hôpitaux	15
Pédiatres, Médecins généralistes, biologiste LABM	19
Collectivités	5
TOTAL	39

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

### **6.1 Description des activités de recherche en cours notamment uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.**

- **Méthode standardisée pour le génotypage génomique des isolats de *B. pertussis***

En 2016, nous avons commencé le développement d'une méthode cgMLST pour analyser finement la transmission et l'évolution des isolats de *B. pertussis*. Nous avons pour cela sélectionné des isolats collectés par le CNR au cours du dernier cycle de coqueluche ainsi que des isolats historiques et avons entrepris le séquençage de leur génome par la technologie Illumina. Nous avons ensuite inclus des génomes publiquement accessibles d'autres pays. 2038 gènes présents dans tous les isolats ont été retenus, après élimination des artefacts dus au haut G+C% des génomes et aux paralogues, ou à la faible reproductibilité des génotypes pour certains gènes. Ce travail a été réalisé en partenariat avec le groupe de bio-informatique de l'Institut Pasteur (Hub du « C3BI »). Ce système de génotypage a ensuite été implémenté dans une base de données BIGSdb et appliqué à nos isolats et des isolats provenant d'autres pays qui ont été confrontés à de grandes épidémies (USA, UK). L'étude d'isolats issus de cas groupés a permis de calibrer le degré de variation des profils cgMLST en fonction des liens épidémiologiques documentés. Ce travail a été accepté pour publication dans la revue *Emerging Infectious Diseases* (attendue en juin 2018).

## 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

### 6.2.1 Publications internationales

1. Barkoff AM, Mertsola J, Pierard D, Dalby T, Vermedal Hoegh S, Guillot S, Stefanelli P, van Gent M, Berbers G, Vestheim DF, Greve-Isdahl M, Wehlin L, Ljungman M, Fry NK, Markey K, Auranen K, He Q. Surveillance of circulating *Bordetella pertussis* strains in Europe during 1998-2015. **J Clin Microbiol**. 2018 Feb. pii: JCM.01998-17. doi: 10.1128/JCM.01998-1
2. Bouchez V, Douché T, Dazas M, Delaplane S, Matondo M, Chamot-Rooke J, Guiso N. Characterization of Post-Translational Modifications and Cytotoxic Properties of the Adenylate-Cyclase Hemolysin Produced by Various *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* Isolates. **Toxins** (Basel). 2017 Sep 26;9 (10).
3. The length of poly(C) stretch in the *Bordetella pertussis* Pfim3 promoter determines the vag or vrg function of the fim3 gene. Otsuka N, Guiso N, Bouchez V. **Microbiology**. 2017 Sep; 163 (9):1364-1368.
4. Bouchez V, AlBitar-Nehmé S, Novikov A, Guiso N, Caroff M. *Bordetella holmesii*: Lipid A Structures and Corresponding Genomic Sequences Comparison in Three Clinical Isolates and the Reference Strain ATCC 51541. **Int J Mol Sci**. 2017 May 18; 18(5)
5. Guiso N, Levy C, Romain O, Guillot S, Werner A, Rondeau MC, Béchet S, Cohen R. Whooping cough surveillance in France in pediatric private practice in 2006-2015. **Vaccine**. 2017; 35(45): 6083-6088.

### 6.2.2 Communications internationales (invitées)

Sylvain Brisse a été invité à Oslo le 6 septembre 2017 par le consortium EUpertStrain pour participer au meeting annuel de ce réseau. Il a présenté le projet de génomique en cours au CNR « Genomic epidemiology of *Bordetella pertussis* in France ».

### 6.2.3 Communications nationales (invitées)

Sylvain Brisse a donné un séminaire lors du colloque « Vaccination in the extreme ages of life » du réseau français de vaccinologie COREVAC le 12 décembre 2017.

## 7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, 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 reportées. 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 (N+1 et N+2)

- 8.1 Amélioration de l'identification des espèces avec la technologie MALDI-TOF

Lors de la mandature précédente, nous avons mis en place la méthode d'identification des bordetelles par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Il reste nécessaire d'améliorer le contenu de la base de données, surtout pour les espèces moins fréquemment rencontrées. Ce travail de référence sera réalisé en complémentarité de

nos recherches sur la diversité phylogénétique par séquençage génomique. En effet l'approche phylogénétique révélera la diversité des lignées et fournira des souches de référence des différentes espèces et lignées évolutives. Cela permettra de tester la capacité de l'approche MALDI-TOF à différencier toutes les bordetelles et, si nécessaire, d'enrichir les bases de données d'identification. Les souches de nouvelles espèces ont été obtenues et ajoutées à la collection du CNR : *B. pseudohinzii* (REF NCTC 13808T), *B. bronchialis* (REF CCUG 56828T), *B. sputigena* (REF CCUG 56478) et *B. flabialis* (REF CCUG 56827T).

- *Standardisation du typage génomique et dynamique de la transmission des souches à l'échelle européenne et internationale*

Nous avons finalisé le développement d'une méthode cgMLST pour analyser finement le génotype des isolats de *B. pertussis* (Bouchez et al., Emerg Inf. Dis, in press). Le système de typage est très reproductible et une base de données d'allèles de référence publiquement accessible a été développée. Ce système commence à être utilisé par nos collègues à l'échelle européenne et facilitera la compréhension commune de la circulation des isolats à l'échelle internationale. Nous anticipons de former nos collègues Européens à cette approche.

Par ailleurs l'unité de recherche qui héberge le CNR a obtenu un financement pour un projet de génomique comparative à l'échelle européenne (financement : projet INCEPTION, Institut Pasteur, dans le cadre de l'action « Instituts Convergences » de l'ANR). La comparaison génétique des isolats issus de plusieurs pays européens permettra de mieux caractériser la diffusion des souches à l'échelle internationale et de définir les variations de composition des populations de *B. pertussis* entre pays à l'échelle européenne. Ces variations pourront être reliées aux différentes politiques vaccinales. Ce projet de deux ans démarre par un recensement des collections disponibles pour séquençage génomique auprès de nos partenaires Européens.

- *Dynamique évolutive des souches et variation des antigènes vaccinaux*

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*. Il est lié directement à l'évaluation des vaccins et apporte des informations nécessaires aux politiques vaccinales. Dans le cadre du projet INCEPTION ci-dessus, nous nous intéresserons donc particulièrement à la dynamique évolutive des isolats qui ne produisent pas la pertactine (PRN-), qui sont les plus nombreux. Un objectif sera de mieux caractériser l'émergence et la diffusion de ces isolats depuis leur apparition dans les années 2000.

Nous étudierons également l'évolution des autres gènes d'antigènes vaccinaux à l'échelle internationale, ce qui permettra de comparer les dynamiques évolutives dans les différents pays participants et de les confronter à la variation des politiques vaccinales. Nous espérons contribuer ainsi à améliorer la définition des politiques vaccinales par une analyse à haute résolution et à grande échelle de l'évolution des populations de *B. pertussis*.



## Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

### 2.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

#### ✓ Techniques de diagnostic direct

##### Culture

C'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 collège BVH. Nous utilisons le milieu Bordet-Gengou additionné de 15% de sang de cheval, avec ou sans céfalexine, ainsi que le milieu Regan-Lowe 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*
- Confirmation de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker).

Lorsque la confirmation de l'identification de la bactérie est validée, une mise en conserve en SPG/BSA est faite pour assurer un stockage au froid à long terme.

##### PCR en temps réel (ou qPCR) :

Les différents diagnostics par PCR en temps réel réalisés sont ceux ayant comme cible :

- La séquence d'insertion IS481\* 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 le génome. 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 région promotrice de l'opéron de la toxine de pertussis (*ptxA-Pr*) qui est spécifique de l'espèce *B. pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'IS481;
- 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 détecte aussi l'espèce *B. bronchiseptica* dans quelques rares cas;
- La séquence d'insertion IS1001\* qui permet la détection de l'espèce *B. parapertussis* mais aussi quelquefois l'espèce *B. bronchiseptica* (séquence présente dans le génome de certaines *B. bronchiseptica*);
- La séquence en amont du gène de la flagelline *flaA* ; qPCR FLA en 2 temps qui détecte spécifiquement l'espèce *B. parapertussis* et qui permet de différencier cette espèce de l'espèce *B. bronchiseptica*;
- La séquence d'insertion h-IS1001 spécifique de l'espèce *B. holmesii*.

\* : Techniques accréditées selon le référentiel ISO15189.

Le diagnostic moléculaire de la coqueluche (recherche de *Bordetella pertussis* et *parapertussis* par amplification génique) est remboursé par la sécurité sociale depuis mars 2011.

### ✓ *Technique de diagnostic indirect*

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 spécifique d'une infection ou d'une vaccination à *B. pertussis*. 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. Lors de cas groupés de coqueluche dans des collectivités, à la demande des ARS principalement, le CNR effectue tout de même la sérologie, en utilisant une méthode ELISA (trousse commerciale validée lors d'une étude collaborative qui a été publiée en 2014 (Dinu et al. 2014, DMID 78:302-6)).

### ✓ *Vérification de la sensibilité aux anti-infectieux*

Pour les isolats cliniques envoyés ou isolés au CNR, 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 (BIORAD). 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 de *B. pertussis* a été trouvé résistant à ces trois antibiotiques depuis la création du CNR en 1993. 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 bactériens*

#### **Typage des gènes d'antigènes vaccinaux.**

La détermination de la séquence allélique du promoteur de la toxine pertussis, de la pertactine et de la sous-unité S1 de la toxine pertussis est réalisée. Ce typage est fait depuis 2016 par séquençage à haut débit (technologie Illumina). Le séquençage du génome remplace les multiples PCR dédiées et séquençage Sanger précédemment utilisées. Les séquences des gènes d'intérêt sont analysées pour en déterminer les allèles et sont comparées à celles des souches de référence et des souches vaccinales.

#### **Génotypage des souches par séquençage génomique**

Le génotypage des souches est réalisé à partir des données de séquençage Illumina. Le développement du schéma de typage core genome multilocus sequence typing (cgMLST) est en cours de validation.

#### **Vérification de la production des facteurs de virulence**

Elle est réalisée :

- pour les protéines fimbriales : avec des anticorps monoclonaux spécifiques, par agglutination et/ou immunofluorescence ;

- pour la toxine adényl cyclase-hémolysine : par visualisation de l'hémolyse et si nécessaire par le dosage de l'activité adényl cyclase ;

- pour la toxine de pertussis (PT), l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) et la pertactine (PRN) : avec des anticorps polyclonaux spécifiques, par immuno-empreinte (Western blot).

#### **Tests de la virulence dans des modèles in-vivo et in-vitro**

Dans le cas où un isolat présente des caractères génomiques ou phénotypiques différents de ceux généralement décrits, l'unité de recherche a la capacité de tester ses propriétés dans un modèle murin d'infection intranasale, et d'analyser ses interactions avec les macrophages murins (lignée J774.A1) ou les cellules trachéales épithéliales humaines (lignée HTE).

## **2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR**

### ✓ **Culture :**

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

✓ **PCR en temps réel (qPCR):**

La détection de l'ADN de la bactérie peut se faire directement à partir des prélèvements naso-pharyngés (voir site web du CNR pour les aspects pratiques) de patients suspects de coqueluche. Les diagnostics par qPCR à réaliser sont ceux ayant comme cible :

- La séquence d'insertion **IS481** qui détecte l'ADN des espèces *B. pertussis*, mais aussi *B. holmesii* et certaines souches de *B. bronchiseptica*;
- La séquence d'insertion **IS1001** qui détecte l'ADN de l'espèce *B. parapertussis*. La séquence de l'IS1001 est aussi présente dans le génome de certaines *B. bronchiseptica*.

Note sur la spécificité des PCR : Ces 2 qPCR ont l'avantage de détecter avec une grande sensibilité l'ADN des espèces *pertussis* (le plus souvent) ou *holmesii* ou *bronchiseptica* (rarement). Cependant cette très grande sensibilité a deux inconvénients (i) des problèmes de contamination dans certains laboratoires (ii) une mauvaise spécificité. Pour rappel, nous avons réalisé, en 2011, une étude rétrospective afin d'estimer la proportion de détection d'ADN de *B. holmesii* dans des prélèvements respiratoires de patients suspects de coqueluche en France et pour lesquels la qPCR ayant pour cible l'IS481 était positive. Il s'avère que sur 177 extraits d'ADN testés (quantité d'ADN suffisante), 7,8% étaient positifs avec la cible spécifique de *B. holmesii* et négatifs avec la cible spécifique de *B. pertussis*. Parmi ces prélèvements, aucun ne correspondait à des patients de moins de 9 ans.

En fonction des résultats des deux tests qPCR, le CNR recommande :

- CAS n°1 : la PCR IS481 est positive, le CNR recommande d'utiliser les 2 PCR spécifiques d'espèce permettant de différencier l'espèce *pertussis* de l'espèce *holmesii*.

- La région promotrice de l'opéron de la toxine de pertussis (**ptxA-Pr**) qui est spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'IS481 dans nos conditions opératoires;
- La séquence d'insertion **h-IS1001** qui permet la détection spécifique de l'espèce *holmesii* et est aussi sensible que la cible IS481 dans nos conditions opératoires;

Si ces 2 PCR sont négatives, le laboratoire peut envoyer l'ADN (en indiquant la valeur de Ct obtenue avec la cible IS481) au CNR afin qu'il teste les qPCR BP3385 et FLA.

Pour les laboratoires qui ne peuvent pas mettre en place les 2 PCR spécifiques, le CNR recommande de lui envoyer un aliquot d'ADN (en indiquant la valeur de Ct obtenue avec la cible IS481) afin qu'il effectue les qPCR *ptxA-Pr* et *h-IS1001*.

- CAS n°2 : la PCR IS1001 est positive. Si le contexte épidémiologique (par exemple, contacts avec des animaux) et/ou le tableau clinique du patient oriente vers *B. bronchiseptica*, le CNR recommande de lui envoyer un aliquot d'ADN (en indiquant la valeur de Ct obtenue avec la cible IS1001) afin qu'il effectue la qPCR FLA qui permet de faire la distinction entre les 2 espèces, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*.

Les recommandations pour l'envoi d'un échantillon au CNR, quel que soit sa nature, sont indiquées sur le site web du CNR.