



RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2024

Année d'exercice 2023

CNR Coqueluche et autres bordetelloses

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	Unité Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes / Institut Pasteur	Sylvain BRISSE

Résumé analytique - Faits marquants de l'année 2023	5
Executive summary - Highlights of the year 2023	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Organigramme	7
Mission et Organisation	7
Démarche Qualité	7
2. Activités d'expertise	10
2.1 Evolution des techniques	11
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	12
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	12
2.4 Collections de matériel biologique	13
2.5 Activités d'expertises	13
2.6 Activités de séquençage	16
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	18
3. Activités de surveillance	19
3.1 Description du réseau de partenaires	19
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	20
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	22
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	28
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	29
4. Alertes	32
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	34
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	34
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	35
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	35
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	36
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année 2023, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	36
6.2 Liste des publications et communications de l'année 2023, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	39

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux.....	41
8. Programme d'activité pour les années suivantes.....	42
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	45
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	45
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	46
1.3 Locaux et équipements	46
1.4 Collections de matériel biologique.....	46
1.5 Démarche qualité du laboratoire	47
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	48
2.1 Liste des techniques de référence	48
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	50
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques).....	51

Le CNR remercie le réseau de correspondants microbiologistes et cliniciens, et en particulier les membres du réseau RENACOQ, du Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des hôpitaux, et les LABM Cerba 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 des autres infections à bordetelles 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. 2024. 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 DE L'ANNÉE 2023

La coqueluche reste un enjeu majeur de santé publique en France et dans le monde, avec une réémergence observée en 2023-2024. Le rôle principal du Centre national de référence (CNR) pour la Coqueluche et autres bordetelloses est de contribuer à la surveillance de cette infection et des autres infections à bordetelles, sur la base de son volet microbiologique.

En 2023, le CNR a reçu **128 échantillons humains**, représentant 121 cas cliniques. **L'année 2023 a été marquée par le retour de *Bordetella pertussis*, l'agent principal de la coqueluche, à partir d'avril 2023, avec une accentuation notable à partir de l'été 2023**, comme en témoignent les **multiples alertes au niveau national** et les données des deux plus grands laboratoires de ville (Cerba et Eurofins-Biomnis). De plus, **un nombre élevé de tests ont été réalisés pour *B. parapertussis***, le deuxième agent de la coqueluche généralement associé à des infections moins graves, mais la plupart ont été réalisés dans le cadre d'une pseudo-épidémie qui a aussi marqué l'année 2023.

Concernant la recrudescence de *B. pertussis* en 2023, plusieurs **cas groupés** ont été recensés dans différentes régions de France métropolitaine, tant en collectivité qu'au sein de familles, et nous avons collaboré avec SpF et les ARS concernées pour mener les investigations nécessaires. **Nous avons reçu et/ou isolé 12 isolats de *B. pertussis***, contre seulement deux *B. pertussis* en 2022. Contrairement à la période antérieure à la pandémie de Covid-19, où environ la moitié de la population de *B. pertussis* ne produisait pas de pertactine (PRN), **tous les isolats de 2023 se sont révélés produire la pertactine (PRN+) et 82% produisent FIM2**. Concernant une **pseudo-épidémie à *B. parapertussis* dans la région de PACA**, le CNR a reçu au total **33 échantillons** pour confirmation biologique, incluant trois écouvillons non-utilisés « blancs ». Après avoir testé les échantillons pour la recherche du gène cible IS1001 de *B. parapertussis*, il a été observé que 64% d'entre eux présentaient des Ct tardifs (> 38), incluant deux des trois échantillons blancs testés. Suite à plusieurs contrôles, le CNR a conclu, en concertation avec les structures de soin concernées, les autorités sanitaires régionales et nationales ainsi que SpF, que ces cas groupés de *B. parapertussis* étaient très probablement dus à des **échantillons faussement positifs**, du fait d'écouvillons contaminés (situation similaire à celle qui avait été décrite aux Pays-Bas en 2021, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35318925/>). **Cet épisode a souligné l'importance de l'expertise et de la confirmation microbiologique du CNR pour valider tout signal épidémique.**

Concernant **le conseil**, en plus des avis destinés aux cliniciens ou microbiologistes, de la participation à différents cours ou le webinaire SFM-REMIC pour le diagnostic biologique de la coqueluche et révision du chapitre Coqueluche pour l'ePILLY, le CNR a été actif auprès des autorités (plusieurs réunions concernant la pseudo-épidémie à *B. parapertussis* ; et révision de la fiche coqueluche pour le INRS/EFFICATT). De plus, des études sur la recrudescence de la coqueluche à *B. parapertussis* en 2022 ; l'association entre la coqueluche maligne et *B. pertussis* productrice de pertactine chez les nourrissons ; et l'étude de l'épidémiologie et des corrélats biologiques des sérotypes FIM2 et FIM3 de *B. pertussis* -, ont été finalisées .

EXECUTIVE SUMMARY – HIGHLIGHTS OF THE YEAR 2023

Pertussis remains a major public health issue in France and worldwide, where it rapidly re-emerged in 2023-2024. The main role of the National Reference Centre for whooping cough and other *Bordetella* infections (NRC) is to contribute to the microbiological surveillance of this infection in France.

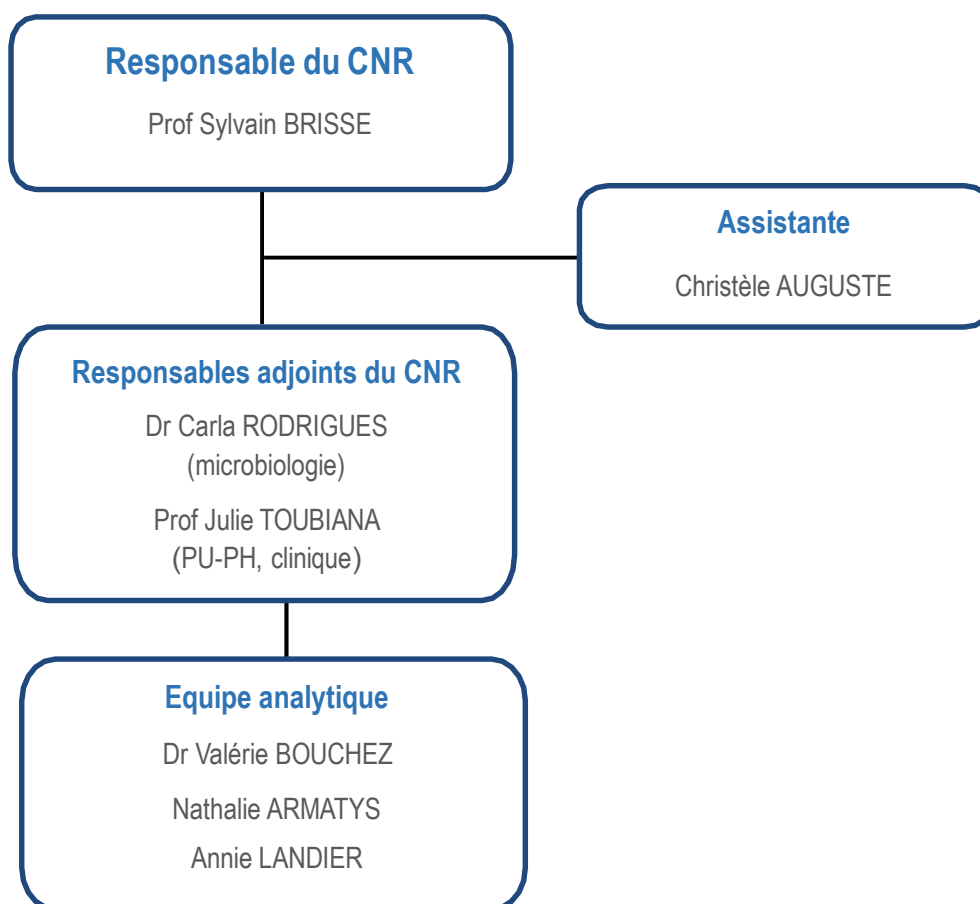
In 2023, the CNR received 128 human samples, representing 121 clinical cases. The year 2023 was marked by the **resurgence of *Bordetella pertussis*, the main agent of whooping cough, starting from April 2023, with a notable increase from the summer of 2023 onwards**, as evidenced by multiple national alerts and data from the two largest private laboratories (Cerba and Eurofins-Biomnis). Additionally, a high number of tests were conducted for *B. paraptussis*, the second agent of whooping cough typically associated with less severe infections, but most of these were carried out within the **context of a pseudo-epidemic that also characterized the year 2023.**

Regarding the resurgence of *B. pertussis* in 2023, **several clustered cases were identified in various regions of metropolitan France**, both in collective settings and within families. We collaborated with SpF and the concerned ARS to conduct the necessary investigations. We received and/or isolated **12 *B. pertussis* isolates**, compared to only two in 2022. In contrast to the period before the COVID-19 pandemic, where approximately half of the *B. pertussis* population did not produce pertactin (PRN-), **all isolates in 2023 were found to produce pertactin (PRN+) and 82% produced FIM2.** Regarding the pseudo-epidemic of *B. paraptussis* in the Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) region, the CNR received a total of 33 samples for biological confirmation, including three unused "blank" swabs. After testing the samples for the presence of the IS1001 target gene of *B. paraptussis*, it was observed that 64% of them exhibited late Ct values (>38), including two out of the three blank samples tested. Following several checks, the CNR concluded, in consultation with the relevant healthcare facilities, regional and national health authorities, as well as SpF, that these clustered cases of *B. paraptussis* were most likely due to falsely positive samples, stemming from contaminated swabs (a situation similar to that described in the Netherlands in 2021, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35318925/>), resulting from contaminated swabs used by the hospital laboratory (similar to the situation described in the Netherlands in 2021). **This episode highlighted the importance of the NRC's expertise and microbiological confirmation in validating any epidemic signal.**

Regarding advisory activities, in addition to guidance for clinicians or microbiologists and participation in the SFM-REMIC webinar for the biological diagnosis of pertussis and revision of Chapter 65 - Pertussis for ePILLY, the NRC was actively engaged with authorities (several meetings concerning the pseudo-epidemic of *B. paraptussis*; and revision of the pertussis record for INRS/EFFICATT). Furthermore, studies on the resurgence of whooping cough due to *B. paraptussis* in 2022; the association between severe whooping cough and pertactin-producing *B. pertussis* in infants; and the investigation of the epidemiology and biological correlates of FIM2 and FIM3 serotypes of *B. pertussis* have been finalized.

1. Missions et organisation du CNR

ORGANIGRAMME



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 de la Coqueluche et autres bordetelloses (ci-après, CNR, sauf précision), et n'a donc pas de laboratoire associé. L'organigramme de l'équipe du CNR est présenté **ci-dessus**. Les missions générales du CNR comprennent l'expertise, le conseil, la surveillance et l'alerte. Ces missions sont détaillées plus spécifiquement en **Annexe 1**.

DEMARCHE QUALITE

Le CNR fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 15 (<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr>). 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 de la Responsabilité Sociétale et Environnementale et des Ressources Techniques 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 (CCR) 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 (voir plus bas, les perspectives concernant la version 2022). L'annexe d'accréditation ainsi que les sites et la portée sont disponibles 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'année Qualité 2023 s'est organisée comme suit :

Étapes clés LREMS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S5 COFRAC	14 au 17 novembre 2023
Revue qualité	30/03/2023
Revue de direction LREMS	04/07/2023
Audits internes qualité (AIQ) et technique (AIT)	AIQ : 05/12/2023 après-midi
Nombre d'écarts/non-conformités mineurs (E-NC min)	0
Nombre d'écarts/non-conformités majeurs (E-NC maj)	0

Lors de l'évaluation COFRAC de novembre 2023, les évaluateurs ont accordé leur confiance au LREMS qui a démontré lors de son évaluation une réponse aux exigences qualité et techniques de la norme ISO 15189 v 2012.

Perspectives 2024 :

En 2024, le LREMS effectue sa transition vers la version 2022 de la norme ISO 15189. Un plan de transition a été établi par le service Qualité et il est déployé tout au long de l'année 2024 au sein des CNR.

Étapes clés LREMS	Prévision de réalisation
Revue qualité	23/04/2024
Revue de direction LREMS	Juin-juillet 2024
Audits internes qualité et technique	Juin - décembre 2024
Audit de surveillance COFRAC	Juin 2025 (demande faite au COFRAC sur le maintien de cette date)

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 2023, nous avons participé à un CQE organisé par QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, Glasgow, Scotland) pour l'identification moléculaire de *Bordetella pertussis* (QCMD 2023 *Bordetella pertussis* DNA EQA Programme - QAB094132_1). En plus, en novembre 2023, nous avons également pris part à un CQE organisé par INSTAND e.V. (Düsseldorf, Allemagne ; <https://www.instand-ev.de/en/instand-eqas/>; Bacterial Genome Detection - *Bordetella pertussis* - 532). Le choix de participer aussi au CQE organisé par INSTAND était motivé par la localisation de l'institution au sein de l'Union Européenne, ce qui diminue les contraintes logistiques liées au transport des échantillons.

Les CQEs de QCMD et INSTAND se composent respectivement de 10 et 4 échantillons. L'objectif était de détecter la présence ou l'absence du matériel génétique des bactéries du genre *Bordetella*, puis dans un deuxième temps, d'identifier l'espèce par typage moléculaire. La première étape a consisté à extraire l'ADN des 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. Pour les 14 échantillons nous avons donné une réponse exacte (au niveau du genre *Bordetella*). Dans un deuxième temps, nous avons effectué le typage moléculaire par qPCR en utilisant d'autres cibles spécifiques d'espèce (*ptxA-Pr*, *h-IS1001* et *FLA*). Nous avons aussi obtenu des résultats exacts pour les 14 échantillons quelle que soit l'espèce de *Bordetella* à identifier.

En conclusion, le CNR a obtenu un taux de réussite de 100% lors des deux CQE de l'année 2023.

2. Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est donnée en **Annexe 2**. Il n'y a pas eu de changements de nos activités d'expertise en 2023. Le CNR reste le laboratoire de référence national pour l'identification ou la confirmation moléculaire des différentes espèces de bordetelles. Les demandes d'isolement, 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 2023, le CNR a été contacté par l'ARS Provence-Alpes-Côte d'Azur à la suite d'un signalement concernant **136 cas de coqueluche à *B. paraptussis*** chez des patients et des soignants du Centre Hospitalier (CH) d'Avignon. Lors de cet épisode, la détection de *B. paraptussis* était le plus souvent fortuite car les manifestations cliniques n'étaient pas toujours évocatrices de la coqueluche, et les valeurs de Ct étaient homogènes et élevées, ce qui n'était pas représentatif de la distribution habituelle lors d'une épidémie. Dans ce contexte, le CNR a soulevé la possibilité de l'existence de faux positifs, ce qui a nécessité la réalisation de contrôles supplémentaires sur des prélèvements ainsi que sur des écouvillons non utilisés stériles (« blancs ») provenant du même lot utilisé pour l'échantillonnage hospitalier. Au total, **28 échantillons provenant du CH d'Avignon et 5 du CH d'Aix-en-Provence** ont été transmis au CNR pour confirmation biologique, incluant trois écouvillons « blancs ». Les échantillons ont été testés pour la recherche du gène cible IS1001 de *B. paraptussis*, et il a été observé que 64% d'entre eux présentaient des Ct tardifs (> 38). Cela incluait deux des trois échantillons blancs testés. Après plusieurs contrôles, le CNR a conclu, en concertation avec les autorités sanitaires régionales et nationales ainsi que SpF, que ces cas groupés de *B. paraptussis* représentaient très probablement une **pseudo-épidémie liée à des échantillons faussement positifs**, dus à des écouvillons contaminés utilisés par le laboratoire de l'hôpital (situation similaire à celle qui avait été décrite aux Pays-Bas en 2021, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35318925/>).

Entre août et octobre 2023, plusieurs **cas de coqueluche intra-familiale à *B. pertussis*** ont été détectés et confirmés par le CNR, en lien avec l'ARS de Hauts-de-France (2 cas, département 59), Auvergne-Rhône-Alpes (3 cas, département 74) et Île-de-France (4 cas, département 94). Un des cas intra-familiaux était lié à des **cas groupés de coqueluche à *B. pertussis* issus d'une collectivité scolaire** qui avait été signalée par l'ARS de Hauts-de-France (6 cas, département 59) et confirmée par le CNR début août 2023. De plus, en août 2023, le CNR en lien avec le centre AP-HP Necker-Enfants malades a signalé un cas groupé (dans la même communauté de gens du voyage) de coqueluche à *B. pertussis* à l'ARS Île-de-France, concernant un **nouveau-né décédé en réanimation** et un nourrisson de 3 mois hospitalisé. Sur l'ensemble de ces alertes, en plus de la confirmation moléculaire de l'espèce *B. pertussis*, le CNR a réussi à cultiver **4 souches de *B. pertussis***, ce qui a permis leur analyse microbiologique (voir partie 3.2).

En janvier 2023, en plus de son expertise sur les cas groupés signalés par l'ARS, le CNR a été sollicité par l'**Institut Pasteur de Guinée (Conakry)**, en collaboration avec l'agence nationale de sécurité sanitaire de Guinée, pour confirmer le diagnostic de la coqueluche lors d'une épidémie en cours. Cette épidémie avait été initialement déclarée comme étant causée par *Streptococcus pneumoniae*. Le CNR a reçu 10 prélèvements respiratoires et a pu confirmer au niveau moléculaire qu'il s'agissait de **cas de coqueluche à *B. pertussis***.

2.1 Evolution des techniques

Depuis 2022, le CNR utilise plusieurs approches génomiques qu'il a développées les années précédentes (Bridel, Bouchez et al., Nat Commun, 2022) et rendues disponibles sur la plateforme BIGSdb-Pasteur (<https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>). Ces analyses permettent d'effectuer : **a) le génotypage 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); fimbriae (FIM2 et FIM3) et pertactine (PRN); et c) la **détection de la mutation 23S rRNA associée à la résistance aux macrolides** et d) génotypage de l'espèce *B. pertussis* (cgMLST_ *pertussis*). 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., Emerg Inf Dis, 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.

En 2023, nous avons également commencé le développement d'une nouvelle **PCR en temps réel pour la détection de la mutation dans l'ARN ribosomique 23S conférant la résistance aux macrolides**, basée sur la publication de Kamachi et al. (https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/10/20-1035_article). Nous avons apporté des modifications pour l'adapter au système TaqMan et à notre thermocycleur LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Les résultats préliminaires ont montré la capacité de distinguer les isolats résistants aux macrolides et de ceux qui y sont sensibles. La technique est en cours de validation notamment la détermination des limites de détection, et sera rapidement ensuite introduite en routine au CNR.

Actuellement, la principale difficulté pour la surveillance de la coqueluche réside dans la diminution de la pratique de la culture microbiologique des agents de la coqueluche, *B. pertussis* et *B. parapertussis*, par les laboratoires de biologie médicale. En effet leur isolement en culture est très laborieux, demande une expertise technique spécialisée et des milieux spécifiques à la croissance des *Bordetelles*, et se prête mal à l'accréditation en biologie médicale. Les laboratoires réalisent donc de moins en moins la culture. En 2023, seulement 3 souches (1 *B. pertussis* et 1 *B. parapertussis*) nous ont été directement transmises par les laboratoires partenaires pratiquant encore la culture. Pour pallier ce problème de remontée d'isolats, le CNR a mis en place une communication régulière avec les laboratoires afin de les aider à maintenir la culture (**voir section 2.3**). De plus, en 2023, le CNR a sollicité et conseillé les laboratoires partenaires ne pouvant mettre en œuvre la culture pour qu'ils envoient les prélèvements dans de bonnes conditions afin que le CNR procède à leur mise en culture. Ainsi, le CNR a tenté de mettre en culture **35 prélèvements respiratoires**, ce qui représente 36% des prélèvements de 2023. Le taux de réussite a été de 35%, avec la récupération de **11 *B. pertussis* et 1 *B. parapertussis*** multipliant ainsi quasiment par 4 le nombre de souches analysées en 2023, c'est à dire un total de 12 isolats de *B. pertussis* et 3 de *B. parapertussis*.

Cette activité de mise en culture de prélèvements s'est fortement accélérée dans notre CNR depuis 2022 (**voir tableau ci-dessous**). Avant la période Covid-19, elle était considérée comme une activité complémentaire car la remontée des souches bactériennes responsables de la coqueluche (*B. pertussis* et *B. parapertussis*) était beaucoup plus importante car le nombre de laboratoires de microbiologie pratiquant alors la mise en culture était plus élevé.

Tableau : Nombre d'échantillons mise en culture au CNR et nombre d'isolats reçus au CNR en 2023

Mise en culture par le CNR				Souches remontées au CNR
Année	Nombre d'échantillons pour mise en culture	Nombre de cultures positives obtenues (%)	Espèces (nombre)	Espèces (nombre)
2017	7	0		66 <i>B. pertussis</i> 2 <i>B. parapertussis</i>
2018	17	3 (18%)	3 <i>B. pertussis</i>	62 <i>B. pertussis</i> 6 <i>B. parapertussis</i>
2019	23	2 (9%)	2 <i>B. pertussis</i>	46 <i>B. pertussis</i> 3 <i>B. parapertussis</i>
2020	5	3 (60%)	3 <i>B. pertussis</i>	8 <i>B. pertussis</i>
2021	0	0		
2022	19	9 (47%)	1 <i>B. pertussis</i> 8 <i>B. parapertussis</i>	1 <i>B. pertussis</i> 10 <i>B. parapertussis</i>
2023	33	12 (36%)	11 <i>B. pertussis</i> 1 <i>B. parapertussis</i>	1 <i>B. pertussis</i> 2 <i>B. parapertussis</i>
2024	53	24 (45%)	24 <i>B. pertussis</i>	2 <i>B. pertussis</i>
(en cours)		5 en cours		

Période Covid-19 indiquée en gris

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

En 2023, le CNR 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 2023, 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 et autres. Sur la base 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 CNR le 24 juin 2022. Les différentes actions identifiées pour aider à poursuivre la mise en culture des bordetelles ont été mises en place début janvier 2023 : 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 à la demande de l'envoi par le CNR aux laboratoires demandeurs de boîtes de Bordet-Gengou et/ou de Regan-Lowe.

2.4 Collections de matériel biologique

Mises en collection

En 2023, nous avons stocké 34 isolats décrits dans la **section 2.5.1**.

Distribution de souches/ADN

Depuis 2023, nous avons pris la décision générale de faire la distribution des souches de référence directement depuis la Collection de l'Institut Pasteur (CIP). Pour faciliter cette démarche, nous avons créé sur notre site web un onglet dénommé « **Recommandations et ressources pour le diagnostic** » (<https://www.pasteur.fr/fr/recommandations-ressources-diagnostic>), où sont répertoriées les souches validées par le CNR pour la culture et le diagnostic moléculaire, et qui sont disponibles dans le catalogue de la CIP. Nous envisageons en 2024 de collaborer avec la CIP pour constituer un panel de souches de *Bordetella* plus étendu.

2.5 Activités d'expertises

2.5.1 Nombre d'échantillons cliniques reçus et analysés au CNR en 2023

Pour l'année 2023, nous avons analysé au total **128 échantillons cliniques** repartis de la façon suivante :

- **22 isolats** de *Bordetella* spp., déjà isolés pour lesquels nous avons confirmé l'identification.
- **64 prélèvements respiratoires** et **9 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*.
- **12 prélèvements respiratoires** à partir desquels nous avons obtenu une **culture positive**.
- **21 prélèvements respiratoires** non cultivables mais identifiés comme *Bordetella* par PCR.

De plus, **25 échantillons constitués d'écouvillons stériles (« blancs »)** sur lesquels des PCR ont été réalisées afin de rechercher la présence éventuelle de l'ADN de *Bordetella* ont été analysés lors de l'investigation de la pseudo-épidémie de coqueluche à *B. parapertussis* dans la région PACA. Ces échantillons ont été envoyés par divers correspondants, parmi lesquels le CH d'Avignon et d'Aix-en-Provence, d'autres provenaient de notre laboratoire.

Au total, les échantillons humains reçus (n=128) correspondaient à **121 cas cliniques**. En général, l'année 2023 a été marquée par une augmentation significative du nombre d'échantillons biologiques envoyés au CNR (44 en 2021 ; 100 en 2022 ; 128 en 2023).

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	34
	Antibiogrammes	Non applicable	34
	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	34
	Vérification de la production des protéines vaccinales déterminants de virulence	Non applicable	34
Prélèvements respiratoires	Mise en culture	< 12 jours	35
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	228 ¹
	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. paraptussis</i> , <i>B. holmesii</i> et <i>B. bronchiseptica</i>)	< 7 jours	150 ¹

¹ CQE exclus.

Bien que le nombre d'isolats soit plus faible que l'année précédente (49 en 2022), il y a eu une augmentation du nombre d'isolats de *B. pertussis* obtenus (comme indiqué dans le tableau de la page 12 et ci-dessous) ; il y a eu une augmentation marquée du nombre de PCRs réalisées par le CNR, surtout à partir du deuxième semestre de 2023. Cette augmentation est principalement liée à la pseudo-épidémie de *B. paraptussis* en juillet 2023 et à **une recrudescence réelle de *B. pertussis* surtout à partir de juillet 2023**, comme en témoigne le nombre de *B. pertussis* isolées au CNR directement à partir des échantillons respiratoires.

2.5.2 Nombre d’isolats cliniques reçus au CNR en 2023

Les détails du nombre d’isolats, isolés ou reçus pour confirmation de l’identification au CNR en 2023, sont présentés dans le **Tableau** ci-dessous :

Tableau : Nombre d’isolats reçus ou isolés au CNR en 2023

Source	Espèce	2023
RENACOQ		
	<i>B. pertussis</i>	9
	<i>B. parapertussis</i>	3
HORS RENACOQ (dont Col.BVH, LABM)		
	<i>B. pertussis</i>	3
	<i>B. parapertussis</i>	0
	<i>B. bronchiseptica</i>	13
	<i>B. holmesii</i>	2
	<i>B. hinzii</i>	2
	<i>B. trematum</i>	1
	<i>B. petrii</i>	1
TOTAL		34

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

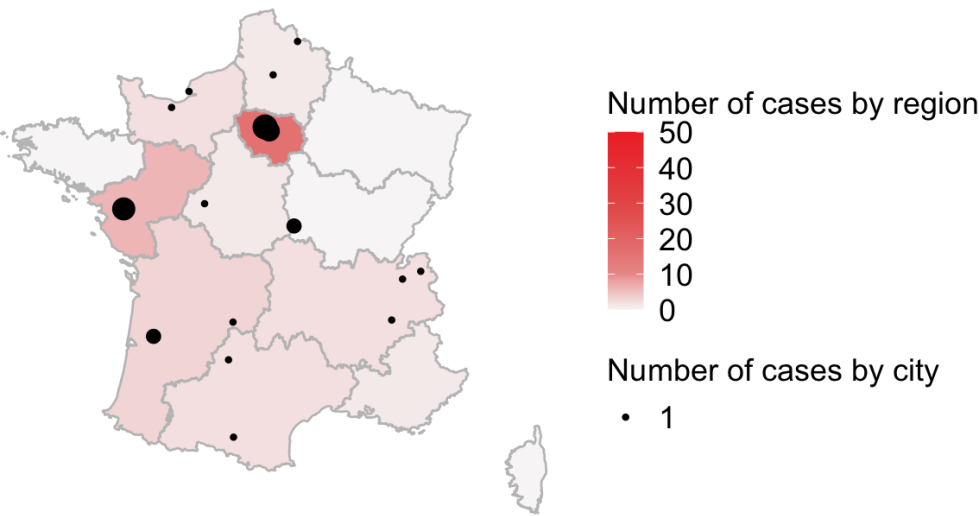


Figure. Répartition géographique en France métropolitaine des isolats de *Bordetella* envoyés au CNR en 2023

2.5.3 Nombre de qPCR réalisées en 2023

Le nombre de qPCR effectuées par le CNR en 2023 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), dans le cadre d'expertise internationale et dans le cadre des CQEs (QCMD BPDNA2023 et INSTAND BP2023).

Tableau : Nombre de qPCR réalisées en 2023

Type de PCR	Nombre Total	IS481 [#]	IS1001 [#]	Pta (promoteur de la toxine de pertussis)	<i>h-IS1001</i>	Fla (flagelline)	BP3385 (Bp)
Surveillance	155	38	38	31	31	8	9
Demande des ARS lors de cas groupés	173	66	66	9	9	20	3
Expertise internationale	50	10	10	10	10	0	10
Contrôle de Qualité Externe (QCMD, INSTAND)	54	14	14	9	9	6	2
Total	432	128	128	59	59	34	24

[#]techniques accréditées

2.6 Activités de séquençage

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
☐ NON	
☒ OUI	Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, précisez quelle(s) plateforme(s) 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. 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.

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
☐ NON	
☒ 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 ?	
☐ NON	
☒ 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. Emerg Inf Dis 2018) ou de 1415 pour le cgMLST du genre <i>Bordetella</i> (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. paraptussis* 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 systématiquement.

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

12 souches de *B. pertussis* et 3 *B. paraptussis*.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

34 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. Les fichiers fastq sont alors déposés dans ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>)

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/ou notre plateforme BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>).

Les séquences de 2023 sont stockées dans notre plateforme BIGSdb-Pasteur ; en 2023, 34 séquences ont été introduites. Elles sont partagées à des fins de santé publique ou avec nos collaborateurs.

3. Activités de surveillance

L'année 2023 a été marquée par deux épisodes très distincts en matière de surveillance : i) **la pseudo-épidémie de coqueluche à *B. parapertussis*** dans la région PACA, **liée à des écouvillons contaminés**. Cet épisode a souligné l'importance de l'expertise et de la confirmation microbiologique du CNR pour valider tout signal épidémique ; ii) **la recrudescence de *B. pertussis*, l'agent principal de la coqueluche, surtout à partir de juillet 2023**. Ces données sont en phase avec les observations issues des laboratoires Cerba et Eurofins-Biomnis (voir section 3.5). Le CNR a reçu ou isolé **12 souches de *B. pertussis*** qui ont été étudiées au niveau génomique et microbiologique (statut de production de pertactine (PRN), sérotypage). Contrairement à ce qui prévalait avant la période Covid-19, où environ la moitié de la population de *B. pertussis* était PRN-, **100% des isolats de 2023 se sont révélés PRN+ et 82% produisent FIM2**.

Depuis 2021, la proportion d'isolats de ***B. bronchiseptica* impliqués dans des infections humaines** et reçus au CNR continue à être élevée (18 en 2022, 13 en 2023), avec une diversité de lignées phylogénétiques.

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 2023, nous avons reçu 128 échantillons biologiques qui proviennent essentiellement de :

- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. parapertussis* et dont les échantillons sont collectés par les cliniciens du réseau RENACOQ (n=31 ; 24%) ;
- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. parapertussis* et dont les échantillons sont collectés par les cliniciens hors réseau RENACOQ, surtout par les bactériologistes du Col.BVH (n=9 ; 7%) ;
- ✓ Patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (par exemple crèche, établissements scolaires, collectivités type EHPAD) – demandes ARS (n=49 ; 38%) ;
- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. parapertussis* et dont les échantillons sont collectés par les LABM (surtout Cerba et Eurofins-Biomnis) et envoyés pour la mise en culture (n=10 ; 8%) ;
- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. parapertussis* et dont les échantillons sont collectés par les cliniciens hors DOM dans le cadre d'une expertise internationale (n=10 ; 8%) ;
- ✓ Patients infectés par *B. bronchiseptica* ou par d'autres espèces de bordetelles et envoyés, le plus souvent, par les bactériologistes du Col.BVH (n=19 ; 15%).

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 2023. 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 CNR depuis 2017.

On observe une importante augmentation du nombre de PCR réalisées en 2023 (**voir graphique ci-dessous**), après une baisse très nette en 2020, avec un nombre total similaire à celui de l'année 2018. Ces données reflètent le caractère cyclique de la coqueluche (cycles de 3 à 5 ans), avec **la recrudescence de la circulation de *B. pertussis* surtout depuis juillet 2023**, ainsi que l'épisode de pseudo-épidémie de coqueluche à *B. parapertussis* observé dans la région PACA. **Une reprise importante de la coqueluche pourrait survenir rapidement au vu de ces données, comme le confirme le début 2024 (données non montrées).**

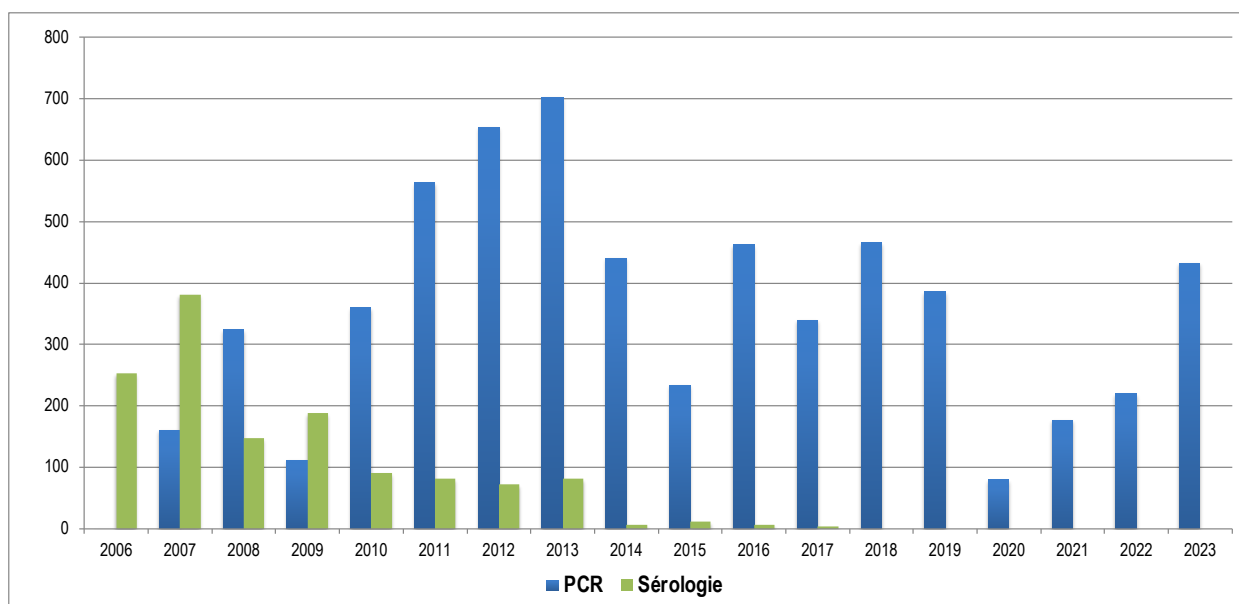


Figure. Nombre de PCR et de sérologies réalisées par le CNR depuis 2006

Parmi les **94 prélèvements respiratoires ou ADN extraits analysés par PCR en 2023**, nous avons obtenu (hors doublons) :

- 29 PCR positives à *B. pertussis* (3 cas chez des nouveau-nés de moins de 1 mois, 9 cas chez des nourrissons de moins de 12 mois, et 14 cas chez des enfants d'âge moyen de 4 ans et 1 cas chez un adulte, répartis dans plusieurs régions de France métropolitaine ; 2 cas en Guinée Conakry).
- 1 PCR positive à *B. parapertussis* (1 nourrisson âgé de 1 mois, Nantes).

- 34 PCR positives à *Bordetella* – 16 IS481 et 18 IS1001 positives pour lesquelles l'espèce n'a pas pu être précisée. Parmi les **16 cas IS481 positifs**, on compte 3 cas chez des nourrissons de moins de 12 mois, 7 cas chez des enfants d'âge moyen de 7 ans, et 1 cas chez un adulte, répartis dans plusieurs régions de France métropolitaine. De plus, 5 cas ont été signalés en Guinée Conakry. Pour les **18 prélèvements IS1001 positifs**, ils étaient tous liés à la pseudo-épidémie de coqueluche à *B. parapertussis* dans la région PACA, et ils présentaient tous un **Ct très tardif (>38)**. Ces prélèvements ont été effectués sur des patients et/ou des agents de santé, avec seulement 3 cas chez des nourrissons de moins de 12 mois et les autres chez des adultes d'âge moyen de 55 ans.
- 30 PCR négatives à *Bordetella*.

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

La répartition des isolats par espèce et par année depuis 1995 est présentée dans la **figure ci-dessous**. Malgré le faible nombre d'isolats (49 en 2022 contre 34 en 2023), il est important de noter les différences observées au niveau des espèces détectées en 2023. En 2023, *B. pertussis*, principal agent de la coqueluche, représentait 35% des isolats traités au CNR contre 4% en 2022. En revanche, *B. parapertussis*, qui représentait 37% des isolats en 2022, ne représente plus que 9% en 2023, étant donc redevenu minoritaire par rapport à *B. pertussis* comme dans la période pré-2020. En 2023, *B. pertussis* et *B. bronchiseptica* représentaient ensemble 73% des isolats (35 % et 38% respectivement).

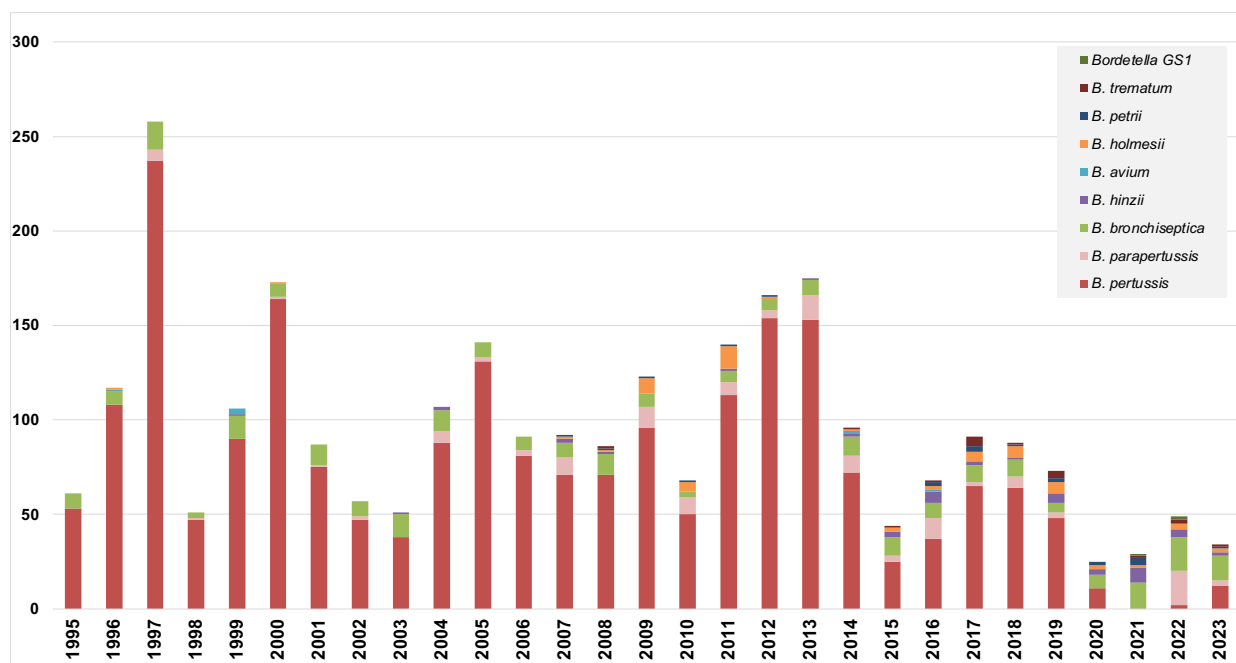


Figure. Répartition des isolats de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1995

3.2.3. Diversité phylogénétique des souches isolées ou cultivées au CNR en 2023

La diversité des 34 souches de *Bordetella* analysées au CNR en 2023 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 Comms, 2022) ; en bleu sont représentés les génomes des isolats reçus ou cultivés au CNR en 2023.

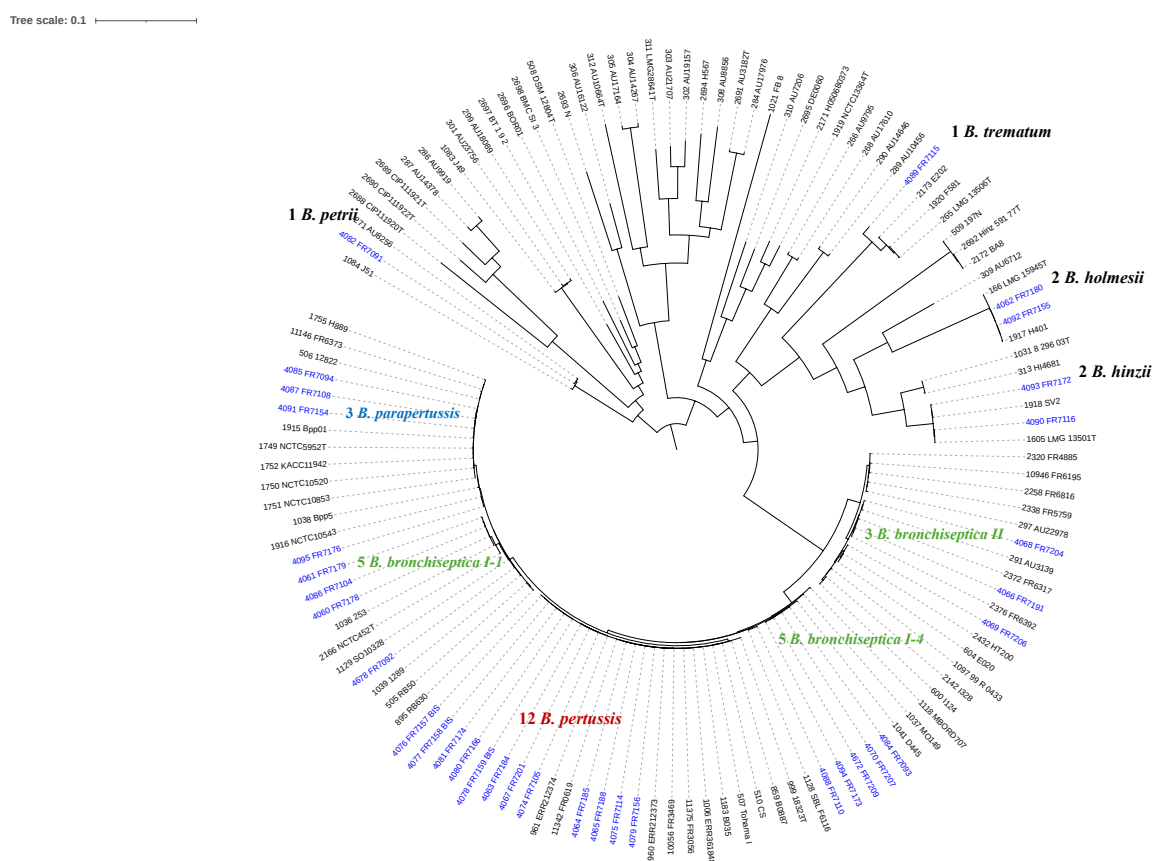


Figure. Arbre phylogénétique déduit de l'analyse génomique des 34 isolats (en bleu) de *Bordetella* reçus au CNR en 2023

En rouge : 12 *B. pertussis*, vert : 13 *B. bronchiseptica*, bleu : 3 *B. parapertussis*.
En noir, les autres bordetelles : 2 *B. hinzii*, 2 *B. holmesii*, 1 *B. trematum* et 1 *B. petrii*

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

L'évolution du nombre d'isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus ou isolés chaque année au CNR depuis 1995 est présentée dans la **figure ci-dessous**. La tendance temporelle reflète l'épidémiologie de la coqueluche qui évolue selon des cycles de 3 à 5 ans. Le dernier cycle épidémique en France semble correspondre aux années 2015-2020, avec un pic entre 2017 et 2018. En 2022, nous n'avons observé pratiquement aucun cas de coqueluche à *B. pertussis* ; en revanche, en 2023, nous avons observé une augmentation du nombre d'isolats de *B. pertussis* qui a été multiplié par 6 (par rapport à 2 isolats en 2022), évocateur d'une recrudescence de *B. pertussis*, qui se confirme début 2024 (données non montrées).

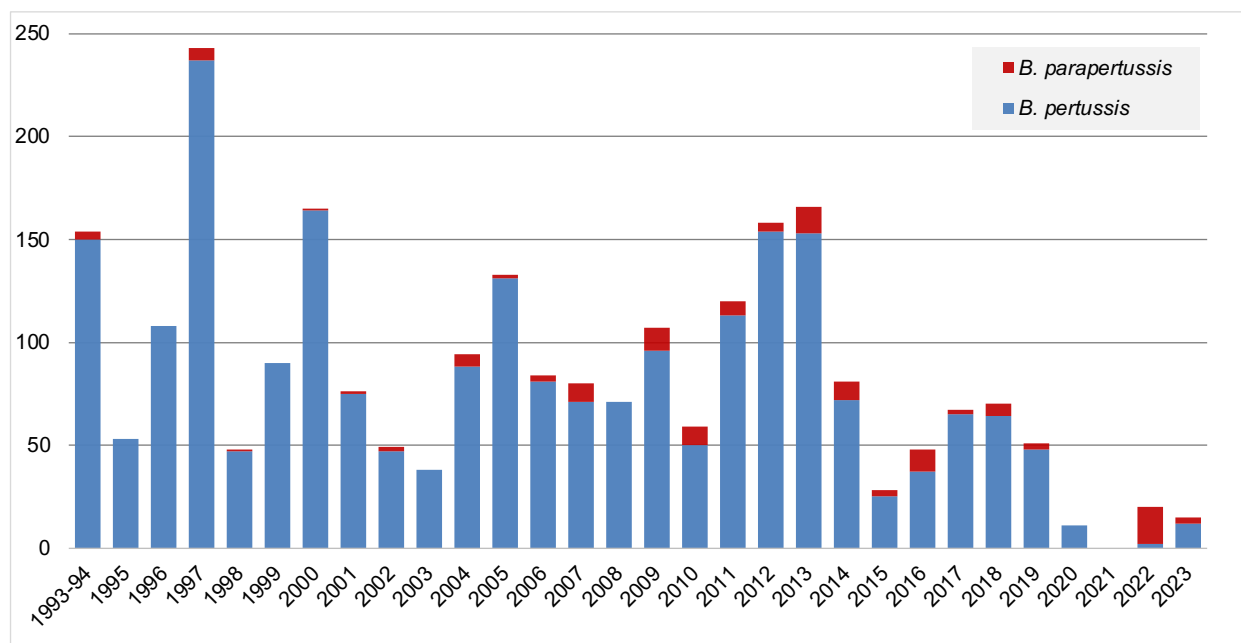


Figure. Répartition des isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus ou isolés au CNR entre 1993 et 2023

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), ce qui peut être attribué à un effet combiné de la fin du cycle épidémique 2017-2019 et du contexte sanitaire exceptionnel dû à la Covid-19.

En revanche, en 2023, nous avons reçu et/ou isolé **12 isolats de *B. pertussis***, la grande majorité (75 %) provenant des bactériologistes du réseau RENACOQ (surtout AP-HP Necker mais aussi Nantes et Aix-en-Provence) ou du LABM Cerba, avec 4 isolats liés à des cas groupés. Ces 12 isolats représentaient 11 cas cliniques, incluant 2 nouveau-nés de moins de 1 mois, dont **l'un est décédé en réanimation**, **5 nourrissons de moins de 12 mois**, 2 enfants âgés de 1 et 5 ans, et 1 adulte de 68 ans. Pour les deux isolats en provenance de l'AP-HP Necker associés aux cas groupés, nous avons constaté une proximité phylogénétique (seulement 4 différences cgMLST sur 2038 gènes analysés).

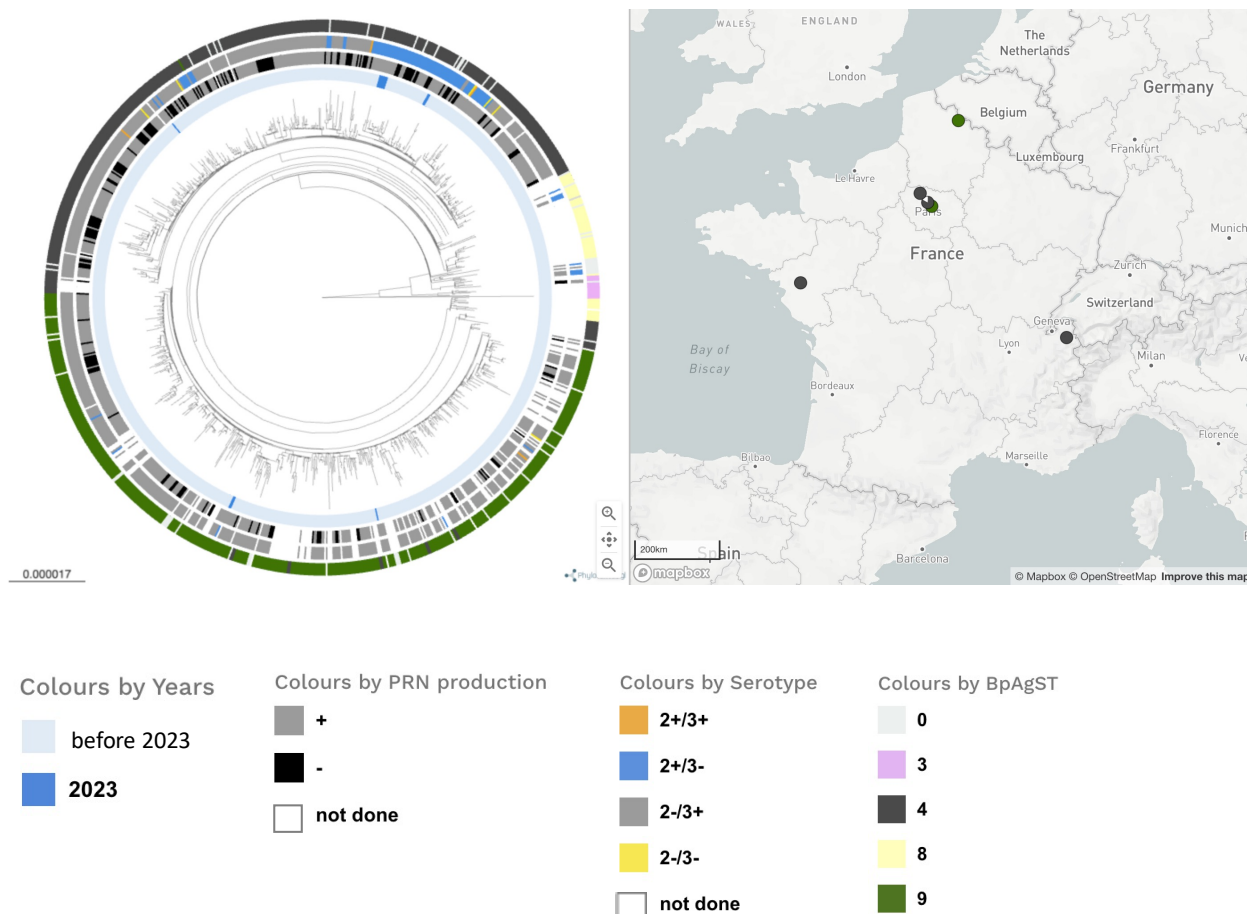


Figure. Arbre phylogénétique déduit de l'analyse génomique des 12 *Bordetella pertussis* analysés au CNR en 2023
 Le cercle intérieur représente les années : en bleu foncé, 2023. Le deuxième cercle représente la production de PRN (gris : PRN+, noir PRN-).
 Le troisième cercle représente le sérotype (bleu 2+/3-, gris 2-/3+, jaune 2-/3-, orange 2+/3+).
 Le cercle extérieur représente le résultat du génotypage des antigènes vaccinaux :
 noir : BpAgST- 4 (*ptxP3*, *ptxA1*, *ptxB1*, *ptxC4*, *ptxD1*, *ptxE4*, *fhaB2400-5500-1*, *fim2-1*, *fim3-1*)
 vert : BpAgST- 9 (*ptxP3*, *ptxA1*, *ptxB1*, *ptxC4*, *ptxD1*, *ptxE4*, *fhaB2400-5500-1*, *fim2-1*, *fim3-2*)
 rose : BpAgST- 3 (*ptxP3*, *ptxA2*, *ptxB1*, *ptxC1*, *ptxD1*, *ptxE4*, *fhaB2400-5500-1*, *fim2-1*, *fim3-1*)
 jaune : BpAgST- 8 (*ptxP1*, *ptxA1*, *ptxB1*, *ptxC1*, *ptxD1*, *ptxE4*, *fhaB2400-5500-1*, *fim2-1*, *fim3-1*)
 Tous sont 23S rRNA-1 (génotype susceptible aux macrolides)

Surveillance de l'évolution des antigènes : La surveillance des antigènes vaccinaux 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 ; *VAXELIS*®, *REPEVAX*®). Les vaccins *VAXELIS*® et *REPEVAX*® introduits en France en 2016 et 2002, respectivement, sont pentavalents contre la coqueluche.

- **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 2023, les 12 souches de *B. pertussis* produisent la PT.**
 - ✓ **Allèles des gènes codant la toxine PT.** En 2023, l'allèle du gène de la sous-unité S1 de la PT est, pour les 12 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 2023, les **12 souches analysées sont de type *ptxP3***, comme les années précédentes.

- **PERTACTINE (PRN) :** Depuis 2007, des souches de *B. pertussis* ne produisant pas l'antigène vaccinal PRN sont observées en France. Avant la période Covid-19, la proportion des souches qui ne produisent pas PRN (PRN-) continuait d'augmenter passant de 47% en 2018 à 50% en 2019 (voir figure ci-dessous). 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) ont été observés au sein du gène *prn* ou de son promoteur pour les autres isolats PRN-. En 2023, **toutes les souches reçues étaient PRN+ contrairement aux années précédentes.**

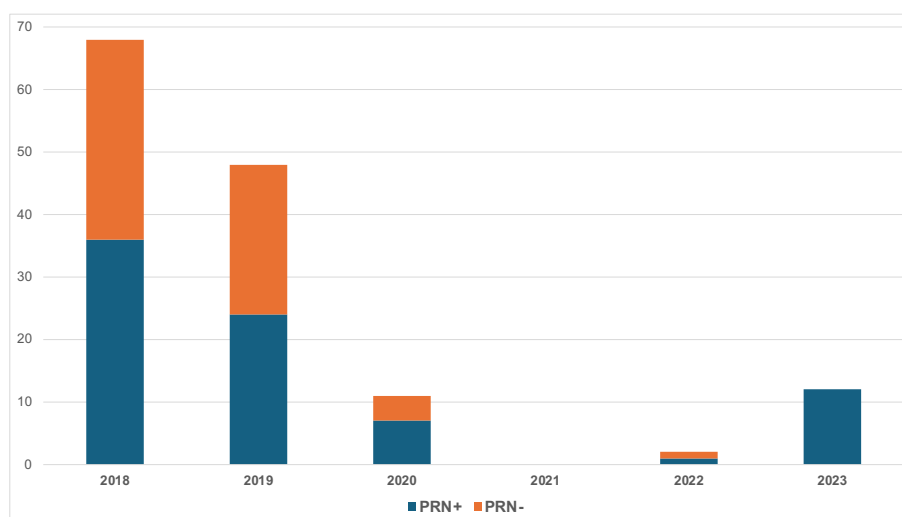


Figure. Répartition des isolats de *B. pertussis* reçus ou isolés au CNR produisant ou non la pertactine entre 1993 et 2023

- **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. En 2023, **10 isolats produisent FIM2** et 2 produisent FIM3.
- ✓ **Allèles de *fim2* et *fim3* :** en 2023, les 12 souches de *B. pertussis* portent l'allèle *fim2*-1 ; 9 portent l'allèle *fim3*-1 et 3 l'allèle *fim3*-2.

- **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-négatifs. En 2023, les **12 souches de *B. pertussis* produisent la FHA.**

2. *B. paraptussis*

B. paraptussis est aussi responsable de syndromes coquelucheux, typiquement moins sévères. Malgré une légère augmentation de ces infections à partir de 2007, son incidence restée faible comparée à celle de *B. pertussis*. Alors qu'en 2022, nous avons reçu et/ou isolé 18 isolats de *B. paraptussis*, **seulement 3 isolats ont été isolés en 2023.** Ces trois isolats représentaient trois cas cliniques provenant du réseau RENACOQ, incluant un nouveau-né de moins de 2 mois (Nantes), un enfant âgé de 12 ans (Tours) et un adulte de 35 ans (Créteil).

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. En 2022, 28% (5/18) des isolats *B. paraptussis* ne produisaient pas la PRN. En 2023 nous observons **2 isolats sur les 3 collectés qui produisent la PRN.** Le troisième isolat ne la produisant pas présente une délétion caractéristique (delG-1895) au sein du gène codant la PRN.

3.2.5. Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

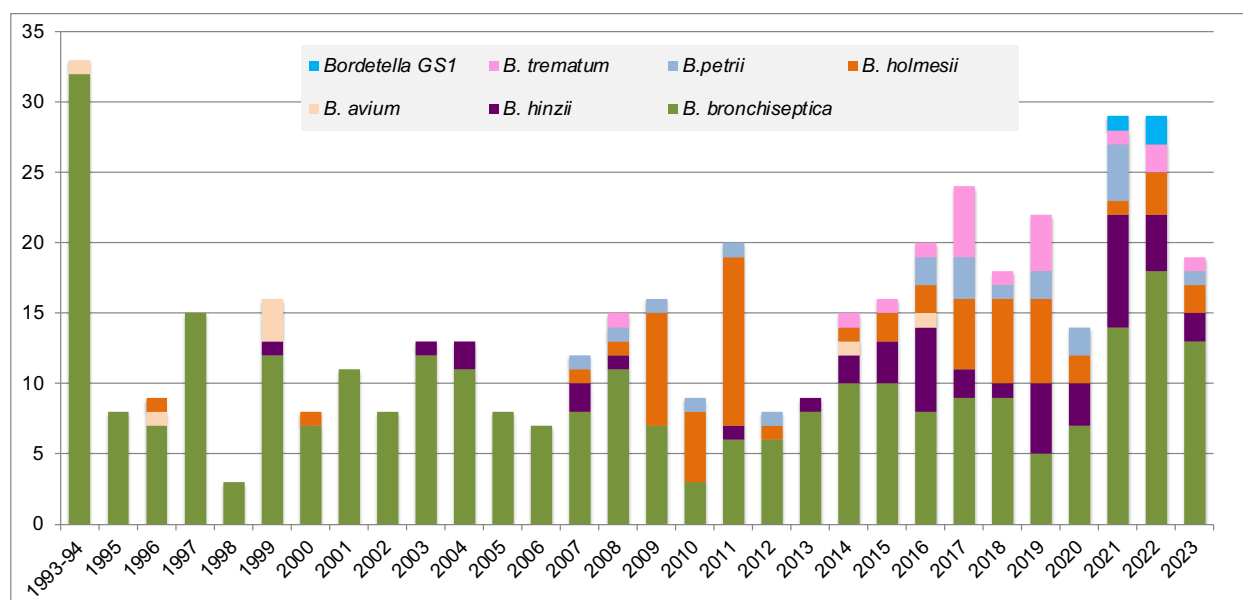


Figure. Nombre d'isolats de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1993, hors *B. pertussis* et *B. paraptussis*

Le CNR a reçu des isolats d'autres espèces de *Bordetella* (n=19, voir **figure ci-dessus**), principalement en provenance des hôpitaux du Col.BVH et isolés de **patients adultes**. Ils se répartissent comme suit :

- **13 isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine** en provenance des différents laboratoires hospitaliers. *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 2023, il s'agit de cas d'infections respiratoires chez des adultes âgés de plus de 55 ans (les âges se répartissent entre 58 et 92 ans, âge moyenne de 75 ans) avec une comorbidité sous-jacente (par exemple, BPCO ou mucoviscidose). Selon l'analyse phylogénétique, **38% (5/13) des isolats appartiennent à la lignée de *B. bronchiseptica* I-1 ; 38% (5/13) à la lignée I-4 et les 23% (3/13) restants à la lignée II (voir Figure en section 3.2.3)**. Deux isolats de *B. bronchiseptica* provenant du même laboratoire (Bordeaux) sont issus de la lignée de *B. bronchiseptica* I-4 mais ne sont pas identiques selon l'analyse phylogénétique.
- **2 isolats de *B. holmesii*** provenant de deux patients distincts de Nantes. *B. holmesii* a été décrite pour la première fois en 1995 et cause généralement des bactériémies chez des patients immunodéprimés, notamment aspléniques ou drépanocytaires. Pour les cas de 2023, il s'agissait d'un patient de 18 ans avec une pneumopathie et d'un patient de 86 ans asplénique depuis 2012 et atteint de drépanocytose. Aucune proximité phylogénétique n'existe entre ces deux isolats.
- **2 isolats de *B. hinzii*** en provenance de Créteil et du Havre. *B. hinzii* est impliquée dans les infections respiratoires chez les volailles. Quelques cas d'infection pulmonaire ou digestive ainsi que des bactériémies ont été décrits chez l'homme. En 2023, les isolats reçus proviennent de prélèvements respiratoires de deux patients : un patient de 67 ans présentant une pneumopathie interstitielle et une colite aiguë, et un autre de 23 ans atteint de dyskinésie ciliaire primitive. Aucune relation phylogénétique proche n'a été observée entre les deux cas.
- **1 isolat de *B. trematum*** provenant d'un LABM à Saint-Martin-d'Hères, issu d'une culture d'un prélèvement cutané chez un patient de 88 ans présentant un écoulement de plaie à la jambe. La première description de *B. trematum* remonte à 1996. Cette bactérie avait été initialement isolée à partir d'infections auriculaires chroniques, mais elle est très rarement associée à des cas de bactériémies ou d'ulcères chroniques.
- **1 isolat de *B. petrii*** provenant d'un laboratoire hospitalier à Epagny, issu d'un prélèvement respiratoire chez un patient de 78 ans ayant une dilatation des bronches. *B. petrii* est une bactérie de l'environnement qui, rarement, peut être associée à une infection respiratoire persistante chez l'homme.

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 haute intensité 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). En 2023, nous n'avons pas observé de cas de *B. pertussis* résistant aux macrolides en France.

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 les souches sont mises en culture en parallèle avec et sans cet antibiotique. En 2023, 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 a été créé en 1996, et est coordonné par SpF et co-coordonné par le CNR pour la partie microbiologique. Il comprend 42 hôpitaux répartis dans toute la France. Nous continuons à animer le volet microbiologique 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. Sur la base 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 mises en place en début 2023. Une nouvelle réunion, plus étendue avec d'autres microbiologistes de France, a été réalisée le 26 mars 2024 pour discuter de l'actualité de la coqueluche en France et renforcer sa surveillance.**

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 (Debin et al., Eurosurveillance, 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 2023, **4 cas de coqueluche confirmés ont été déclarés via ce réseau**, dont 3 causés par *B. pertussis*

et un pour lequel l'espèce n'a pas été identifiée. Les patients concernés avaient respectivement 12 mois, 3 ans, 24 ans et 29 ans.

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.

REMICOQ : Un réseau de Microbiologistes sur la Coqueluche, qui comprend les biologistes intéressés à la coqueluche, a été constitué *de facto* par les réunions organisées par le CNR. Ce réseau comprend les biologistes du réseau RENACOQ, du Col.BVH et de toute autre structure, intéressé par l'actualité de la coqueluche en France et désireux de participer à sa surveillance. L'activité de ce réseau comprend actuellement des réunions (virtuelles) d'échange sur l'épidémiologie et la microbiologie de la coqueluche en France, le partage des modes opératoires du CNR et le partage d'informations par e-mail. L'intention du CNR est de continuer à structurer ce réseau dans les années à venir, en complément des réseaux décrits ci-dessus et des perspectives éventuelles de mise à déclaration obligatoire de la coqueluche chez les nourrissons, envisagée par SpF.

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).

Laboratoire Européen de Référence Diphtérie-Coqueluche : Notre CNR a été invité en 2023 et sélectionné au début de 2024 pour rejoindre le consortium de 4 institutions formant le Laboratoire de Référence de l'Union européenne (EURL) dans le domaine de la coqueluche et de la diphtérie. À la suite de notre nomination officielle par l'UE, la demande de financement est en cours en avril 2024. Ce mandat de laboratoire européen de référence témoigne de notre visibilité à l'international et nous amènera à animer en concertation avec l'ECDC et nos collègues du consortium, un réseau de laboratoires nationaux de référence à l'échelle européenne, avec comme activités principales : CEQs, renforcement de capacité, conseil, séroprévalence, épidémiologie génomique.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Partage de données des LABM Cerba et Eurofins-Biomnis

Nous interagissons avec les laboratoires de biologie médicale Cerba et Eurofins-Biomnis qui réalisent plus de 90% des tests de diagnostic de ville de la coqueluche en France. Nous échangeons régulièrement avec les microbiologistes en charge du diagnostic de la coqueluche au sein de ces deux laboratoires sur l'évolution du nombre et de la proportion de tests positifs en France. Ces deux laboratoires nous envoient chaque mois les données de PCR *Bordetella* qui contribuent à **la surveillance des cas en temps réel**. Cette collaboration a été renforcée fin 2023, avec l'envoi au CNR de prélèvements positifs en PCR avec un Ct faible, pour un essai de mise en culture (N =10).

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

Cible PCR	Nombre de PCR réalisées	Nombre de PCR positives (%)
IS481	5 672	168 (3,0%)
IS1001		7 (0,1%)

Le nombre de PCR coqueluche (IS481/IS1001) réalisées par Cerba en 2023 était de 5 672 (tableau ci-dessus), légèrement supérieur à celui de 2022 (n = 5 129). Sur ces 5 672 PCR, **3,1 % étaient positives**, majoritairement PCR IS481 positives (**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	7 929	327 (4,1%)
IS1001		14 (0,2%)

Pour le LABM Eurofins-Biomnis, sur les 7 929 PCR coqueluche réalisées en 2023, **4,3 % étaient positives** (majoritairement PCR IS481), comme indiqué dans le tableau ci-dessus.

Les données recueillies par ces deux laboratoires indiquent une augmentation significative de la circulation de *B. pertussis* à partir d'avril-mai 2023, un **phénomène qui s'est intensifié considérablement à partir de l'été**, comme le montre clairement la **figure ci-dessous**. Ces résultats corroborent les observations faites au sein du CNR.

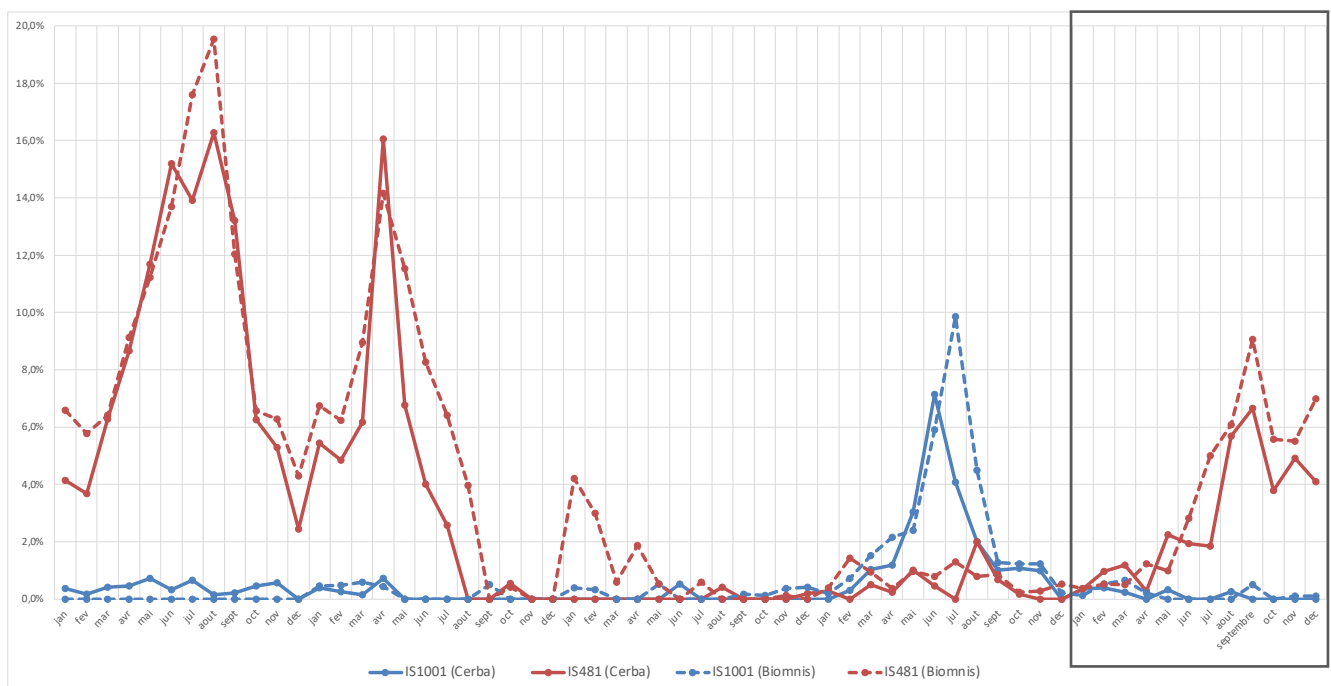


Figure. Pourcentage de PCR coqueluche positives réalisées par les LABM Cerba et Eurofins entre 2019 et 2023

Émergence de *Bordetella parapertussis* en France en 2022

Bouchez V, Toubiana J, Guillot S, Parapertussis 2022 study group, Aït El Belghiti F, Landier A, Armatys N, Trombert-Paolantoni S, Soares A, Rodrigues C, Brisse S. Transient reemergence of *Bordetella parapertussis* in France in 2022. (Soumis au journal *Journal of Medical Microbiology*)

Cette étude ponctuelle réalisée **en collaboration avec SpF et ARS** est décrite en détails dans la section recherche (Voir section 6)

4. Alertes

Lors de cas de coqueluche groupés, 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 et la conduite à tenir émise par le HCSP, et conseille sur les diagnostics biologiques à utiliser. Le CNR est parfois amené à conseiller sur la prise en charge des patients infectés et de leurs contacts.

Les alertes en 2023 se sont principalement concentrées sur le **deuxième semestre** :

- 1) Au début de juillet 2023, **l'ARS PACA** a rapporté 136 cas regroupés de coqueluche à *B. paraptussis* (avec des résultats positifs pour IS1001 entre le 6 et le 18 juillet) au CH d'Avignon, dans le département du Vaucluse (84). Le CNR a été sollicité le 13 juillet pour confirmation biologique et identification de l'espèce *Bordetella*. Face à la résurgence de cas groupés de coqueluche à *B. paraptussis*, SpF a déclenché une alerte le 12 juillet 2023, accompagnée d'un communiqué de presse et de plusieurs conférences téléphoniques impliquant SpF, la DGS-CORUSS, le CNR, l'ARS PACA et le CH d'Avignon (CPIAS et biologistes). La détection de *B. paraptussis* s'est souvent produite de manière fortuite, car les symptômes cliniques n'étaient pas toujours caractéristiques de la coqueluche, et les valeurs de Ct étaient uniformément élevées, ce qui ne correspondait pas au schéma habituel lors d'une épidémie. Dans ce contexte, le CNR a soulevé la possibilité de faux positifs, ce qui a nécessité des contrôles supplémentaires sur les échantillons ainsi que sur des écouvillons stériles (« blancs ») provenant du même lot utilisé pour le prélèvement hospitalier. Au total, **28 échantillons du CH d'Avignon et 5 du CH d'Aix-en-Provence ont été envoyés au CNR pour confirmation biologique**, y compris trois écouvillons « blancs ». Tous les échantillons ont été testés pour la présence du gène cible IS1001 de *B. paraptussis*, et il a été observé que **64% d'entre eux présentaient des valeurs de Ct tardives (> 38), y compris deux des trois écouvillons blancs testés**. Après des investigations approfondies, le CNR, en concertation avec les autorités sanitaires régionales et nationales ainsi que SpF, a conclu que ces cas groupés de *B. paraptussis* constituaient très probablement une **pseudo-épidémie due à des échantillons faussement positifs**, probablement à cause de l'utilisation d'écouvillons contaminés (similaire à ce qui avait été décrit aux Pays-Bas en 2021, référencé ici : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35318925/>). Cette enquête a mis en lumière l'importance de l'expertise et de la confirmation microbiologique du CNR pour valider tout signal épidémique, comme renforcée par SpF (https://www.urps-med-aura.fr/wp-content/uploads/2024/01/FlashInfo33-DMI_janvier-2024v2.pdf). Les résultats des investigations menées conjointement par SpF, le CH, l'ARS et le CNR ont été présentés lors de l'ESCAIDE en 2023. (https://www.postersessiononline.eu/173580348_eu/congresos/ESCAIDE2023/aula/-MP_11_5_ESCAIDE2023.pdf). De plus, cette fausse alerte sera présentée oralement lors des 25e Journées Nationales d'Infectiologie (JNI) en juin 2024.

- 2) Le 10 août 2023, le CNR, en collaboration avec l'AP-HP Necker Enfants malades via notre responsable adjointe clinique, le Professeur Julie Toubiana, a signalé à **l'ARS d'Île-de-France** un cas groupé de coqueluche causé par *B. pertussis*. Ce cas concernait un **nouveau-né décédé en réanimation** et un **nourrisson de 3 mois hospitalisé** en pneumologie pédiatrique, tous deux appartenant à la même communauté. Le nourrisson et sa mère, cette dernière présentant une toux persistante depuis plusieurs semaines, ont été en contact avec plusieurs autres nourrissons de la communauté ainsi que des patients du pédiatre de ville dans la salle d'attente. En plus de la confirmation moléculaire de la présence de l'espèce *B. pertussis*, le CNR a réussi à isoler et cultiver trois souches de *B. pertussis* liées à ce groupe de cas, permettant ainsi leur analyse microbiologique (voir section 3.2). Aucun autre cas lié à ce cluster n'a été signalé au CNR.
- 3) Également, au début du mois d'août 2023, **l'ARS des Hauts-de-France** a contacté le CNR pour signaler six cas groupés de coqueluche causés par *B. pertussis* au sein d'une **collectivité scolaire dans le département du Nord (59)**, détectés entre le 24 et le 31 juillet 2023, parmi des enfants âgés de 3 et 4 ans, ainsi qu'un cas au sein de la même fratrie d'enfants de moins de 1 an. Le CNR a été sollicité pour confirmer l'identification de l'espèce de *Bordetella*. Des PCR complémentaires ont été réalisées et le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. pertussis* pour trois cas.
- 4) À la mi-août 2023, **l'ARS des Hauts-de-France** nous a une nouvelle fois contactés pour signaler **deux cas de coqueluche intrafamiliale** liés aux cas de coqueluche dans la collectivité scolaire décrite précédemment et confirmés par le CNR. Des PCR complémentaires ont été réalisées et le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. pertussis*.
- 5) En mi-septembre 2023, **l'ARS Auvergne-Rhône-Alpes** nous a signalé **trois cas de coqueluche intrafamiliale** dans le département de Cluses (74). Des PCR complémentaires ont été réalisées et le CNR a confirmé l'identification de l'espèce *B. pertussis*, réussissant également à cultiver la souche de *B. pertussis*.
- 6) En octobre 2023, **l'ARS Île-de-France** et l'AP-HP Kremlin-Bicêtre nous ont également contactés pour signaler **quatre cas de coqueluche intra-familiale** causés par *B. pertussis* dans le département 92 (Bagneaux), confirmés par le CNR. L'un des cas concernait un enfant de 1 an hospitalisé.

À la fin de décembre 2023, SpF nous a signalé plusieurs clusters de cas groupés de coqueluche en Île-de-France. Les échantillons correspondants sont arrivés en janvier 2024 et seront traités dans le prochain rapport d'activité.

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 nous efforçons de répondre 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 le 04/03/2024) et le dernier rapport annuel d'activité est en ligne sur le site web du CNR (<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses/rapports-d-activite>).

En 2023, 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 (Tableau ci-dessous). 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).

En avril 2023, nous avons organisé avec l'un des deux principaux LABM (Cerba) autour de la résurgence attendue de la coqueluche et de la nécessité de s'y préparer.

Le jeudi 11 mai 2023, Carla Rodrigues, responsable adjointe du CNR, a été invitée à donner un webinaire organisé par la SFM et le REMIC, qui s'adresse principalement aux biologistes et aux cliniciens, et a présenté le diagnostic biologique de la coqueluche.

Julie Toubiana et Carla Rodrigues ont également révisé le chapitre 65 sur la coqueluche de l'ePILLY en décembre 2023, qui sera publié en 2025.

Julie Toubiana a dispensé en 2023, les cours sur la coqueluche aux étudiants en médecine, et dans le cadre d'un diplôme inter-universitaire de pathologie infectieuse pédiatrique.

Tableau. Sollicitations par téléphone ou par courriel en 2023

	2023
Hôpitaux	15
Pédiatres, Médecins généralistes, Biologiste LABM	4
Collectivités	0
Total	19

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Les responsables du CNR ont participé à cinq réunions avec l'ARS PACA, SpF, le DGS-CORRUSS, ainsi que l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), entre juillet et août 2023, afin de faire le point sur la pseudo-épidémie de coqueluche à *B. parapertussis*.

En février 2023, Sylvain Brisse, Carla Rodrigues et Julie Toubiana ont révisé, à la demande de l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), la fiche intitulée « Coqueluche » pour le « Guide de conduite à tenir après exposition fortuite à un agent biologique en milieu de travail » (EFICATT).

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.

Sylvain Brisse a été interviewé sur la coqueluche en préparation d'un dossier du Figaro, 29 mai 2023, sur « Ces maladies qu'on croyait disparu ». Julie Toubiana a participé en direct le 18 décembre 2023 à l'émission : <https://www.radiofrance.fr/franceculture/podcasts/la-science-cqfd/pneumonies-a-bout-de-souffle-6479136>.

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 2023, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

A) **Études finalisées au début de l'année 2022 et publiées en 2023** (déjà considéré dans le rapport de renouvellement de mandat)

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.

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.

B) Études finalisées en 2023 et soumis ou en prépublication en 2024

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

Contexte : La coqueluche maligne est la forme la plus grave de la coqueluche chez les nourrissons. Les facteurs de virulence de l'agent causal, *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 symptomatiques âgés de moins de 6 mois et présentant une culture positive de *B. pertussis* ont été inclus. Les isolats de *B. pertussis* et les données cliniques ont été collectés via le réseau de surveillance de la coqueluche en France. La coqueluche maligne a été définie comme un cas avec une numération leucocytaire > 40 Giga (10⁹)/L et au moins un des critères suivants : insuffisance respiratoire nécessitant une ventilation, hypertension pulmonaire, choc ou défaillance d'organes multiples. La production de PRN a été évaluée par western blot. Une régression de Poisson modifiée multivariée a été réalisée pour identifier les caractéristiques des patients et microbiologiques associées à la FP.

Résultats : Nous avons inclus 361 nourrissons atteints de coqueluche (âge médian de 63 jours [intervalle interquartile, 39-86]), dont 32 (9%) ont progressé vers la coqueluche maligne. Sur les 361 isolats de *B. pertussis* impliqués, 294 (81%) produisaient de la PRN. Les patients atteints de forme maligne étaient plus souvent des nouveau-nés (risque relatif ajusté [aRR] 3,62, intervalle de confiance à 95% [IC] 1,76–7,44), des nourrissons avec antécédents de prématurité (aRR 7,08, IC à 95% 3,06–16,36), des nourrissons non vaccinés (aRR 4,42, IC à 95% 1,02–19,24), et infectés par des isolats de *B. pertussis* produisant de la PRN (aRR 3,76, IC à 95% 1,02–13,83).

Conclusions : Dans cette grande étude multicentrique, les souches de *B. pertussis* produisant de la PRN étaient indépendamment associés à un risque accru de coqueluche maligne. Alors que des isolats de *B. pertussis* dépourvus de PRN émergent, nos résultats suggèrent une influence positive de la pression sélective exercée par les vaccins contenant de la PRN.

Leroux P, Matczak S, Bouchez V, Volant S, 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 of pertactin-producing *Bordetella pertussis* with fulminant pertussis in infants. (Soumis, et présentation orale à la RICAI 2023, Congrès EUpertStrain 2023))

2. Réémergence transitoire de *Bordetella parapertussis* en France en 2022.

Résumé :

Entre mars et octobre 2022, un pic de détection de *B. parapertussis* par qPCR a été observé en France. Les analyses microbiologiques révèlent que 13 des 18 isolats bactériens collectés en 2022 produisent l'antigène vaccinal pertactine, alors que aucun des 22 isolats collectés dans la période 2016-2021 ne le faisait. Nous

émettons l'hypothèse d'une réintroduction de *B. parapertussis* en provenance de régions du monde où les vaccins à cellules entières sont encore utilisés.

Objectif : Comprendre l'augmentation transitoire de *Bordetella parapertussis* observée en France en 2022, alors qu'elle avait pratiquement cessé d'être signalée depuis le début de la pandémie de COVID-19 en 2020.

Méthodes : Nous avons analysé les données de qPCR des deux plus grands laboratoires de ville français effectuant le diagnostic de la coqueluche et caractérisé tous les isolats de *B. parapertussis* collectés dans la période 2016-2022 par le Centre National de Référence Français pour la Coqueluche.

Résultats : Entre mars et octobre 2022, un pic de détection de *B. parapertussis* par qPCR a été observé en France. Les analyses microbiologiques révèlent que 13 des 18 isolats bactériens collectés en 2022 produisent l'antigène vaccinal pertactine, alors que aucun des 22 isolats collectés dans la période 2016-2021 ne le faisait.

Conclusion : Nous émettons l'hypothèse d'une réintroduction de *B. parapertussis* en provenance de régions du monde où les vaccins à cellules entières sont encore utilisés.

Bouchez V, Toubiana J, Guillot S, Parapertussis 2022 study group, Aït El Belghiti F, Landier A, Armatys N, Trombert-Paolantoni S, Soares A, Rodrigues C, Brisse S. Transient reemergence of *Bordetella parapertussis* in France in 2022. (Soumis au journal *Journal of Medical Microbiology*)

3. Efficacité d'une et de deux doses de vaccins anticoquelucheux acellulaires contre la coqueluche confirmée en laboratoire nécessitant une hospitalisation chez les nourrissons : Résultats du système de surveillance sentinelle PERTINENT dans six pays de l'UE/EEE (2015 - 2019).

Résumé :

Contexte : La surveillance de l'efficacité des vaccins contre la coqueluche est nécessaire pour adapter les stratégies de vaccination. PERTINENT, réseau européen de la coqueluche chez les nourrissons, est un système actif de surveillance sentinelle mis en place dans 35 hôpitaux répartis dans six pays de l'UE/EEE. Notre objectif est de mesurer l'efficacité des vaccins contre la coqueluche (EV) par dose contre l'hospitalisation des nourrissons âgés de moins de 1 an.

Méthodes : De décembre 2015 à décembre 2019, les hôpitaux participants ont recruté tous les nourrissons présentant des symptômes de type coqueluche. Les cas étaient des nourrissons éligibles à la vaccination testés positifs pour *Bordetella pertussis* par PCR ou culture ; les témoins étaient ceux testés négatifs pour toutes les espèces de *Bordetella*. Pour chaque dose de vaccin, nous avons défini un nourrisson comme vacciné s'il/elle avait reçu la dose correspondante >14 jours avant l'apparition des symptômes. Les non vaccinés étaient ceux qui n'avaient reçu aucune dose. Nous avons calculé (modèle à un stade) l'EV groupée comme $100 \times (1 - \text{rapport des cotes de la vaccination})$ ajustée pour le pays, la date d'apparition des symptômes (par tranches de 3 mois) et le groupe d'âge (si l'échantillon le permettait).

Résultats : Sur 1 393 nourrissons éligibles à la vaccination, nous avons inclus 259 cas et 746 témoins. L'âge médian était de 16 semaines pour les cas et de 19 semaines pour les témoins ($p < 0,001$). Le poids de naissance médian et l'âge gestationnel étaient de 3 235 g et de 39 semaines pour les cas, 3 113 g et 39 semaines pour les témoins. Parmi les cas, 119 (46 %) étaient vaccinés : 74 avec une dose, 37 avec deux doses, 8 avec trois doses. Parmi les témoins, 469 (63 %) étaient vaccinés : 233 avec une dose, 206 avec deux doses,

30 avec trois doses. L'EV ajustée après au moins une dose était de 59 % (IC à 95 % : 36-73). L'EV ajustée était de 48 % (IC à 95 % : 5-71) pour la première dose (416 nourrissons éligibles) et de 76 % (IC à 95 % : 43-90) pour la deuxième dose (258 nourrissons éligibles). Seuls 42 nourrissons étaient éligibles pour la troisième dose. Conclusions : Nos résultats suggèrent une EV modérée après une ou deux doses chez les nourrissons. Une taille d'échantillon plus importante permettrait d'obtenir des estimations plus précises pour les doses une, deux et trois.

Merdrignac L, Aït El Belghiti F, Pandolfi E, Acosta L, Fabiánová K, Habington A, García Cenoz M, Bøås H, Toubiana J, Tozzi AE, Jordan I, Zavadilová J, O'Sullivan N, Navascués A, Flem E, Croci I, Jané M, Křížová P, Cotter S, Fernandino L, Bekkevold T, Muñoz-Almagro C, Bacci S, Kramarz P, Kissling E, Savulescu C; Renacog Group; PERTINENT Group. Effectiveness of one and two doses of acellular pertussis vaccines against laboratory-confirmed pertussis requiring hospitalisation in infants: Results of the PERTINENT sentinel surveillance system in six EU/EEA countries, December 2015 - December 2019. *Vaccine*. 2024 Mar 11:S0264-410X(24)00272-X. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.02.090. PMID: 38472070.

C) Études en cours de finalisation

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

Nous étudions l'évolution génomique de *B. paraptussis*, 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. paraptussis* provenant de France, Espagne et USA. Ces génomes ont permis d'analyser la dynamique d'évolution temporelle de *B. paraptussis* et des déterminants de la virulence face à la vaccination anti-coqueluche. Une publication est en cours de finalisation et sera soumise prochainement.

6.2 Liste des publications et communications de l'année 2023, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

a) Publications internationales

1. 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.

b) Communications nationales

1. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors des Journées Départementales de Santé Globale de l'Institut Pasteur le 20 septembre 2023 - « Genomic evolution of *Bordetella parapertussis*, the other agent of whooping cough ».
2. Julie TOUBIANA : présentation orale lors des Journées Départementales de Santé Globale de l'Institut Pasteur le 21 septembre 2023 – « Association between fulminant pertussis and pertactin-producing *Bordetella pertussis* in infants: a multicenter study in France, 2008-2019 ».
3. Julie TOUBIANA : présentation orale lors de la 43ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse le 19 décembre 2023 ; « Association entre la coqueluche fulminante et *Bordetella pertussis* produisant la pertactine chez les nourrissons : une étude multicentrique en France, 2008-2019 »

c) Communications internationales

1. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors de l'EUPertStrain 2023 « Biological differences between FIM2 and FIM3 fimbriae of *Bordetella pertussis*: not just the serotype » le 6 octobre 2023 à Barcelone.
2. Julie TOUBIANA : présentation orale lors de l'EUPertStrain 2023 « Association between fulminant pertussis and pertactin-producing *Bordetella pertussis* in infants: a multicenter study in France, 2008-2019 » le 6 octobre 2023 à Barcelone.
3. David KELLY (membre SpF) – présentation poster lors de l' ESCAIDE 2023 « A pseudo-outbreak of *Bordetella parapertussis* centered on a hospital in France, revealing contamination of nasopharyngeal swabs, July 2023 » le 23 novembre 2023 à Barcelone (https://www.postersessiononline.eu/173580348_eu/congresos/ESCAIDE2023/aula/-MP_11_5_ESCAIDE2023.pdf).

d) Conférences sur invitation

1. Valérie BOUCHEZ : pre-ECCMID day on line « Update on the genomic epidemiology of *B. pertussis* » le 16 février 2023.
2. Carla RODRIGUES : webinaire SFM-REMICs « Le diagnostic biologique de la coqueluche » le 11 mai 2023.
3. Valérie BOUCHEZ : visite de l'Institut Pasteur Seul « Genomic epidemiology of *B. pertussis*, the agent of whooping cough » le 24 août 2023.

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 en effet infecter, ou être portée par, des animaux, dont les chiens, qui peuvent contaminer l'Homme. Ces infections sont toutefois très rarement rapportées. Le CNR reste attentif à ces aspects (nous avons caractérisé 13 isolats dans la période couverte par le rapport) et est ouvert à des collaborations avec des laboratoires vétérinaires. Toutefois à notre connaissance, il n'existe pas de laboratoires experts des bordetelloses animales.

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 :

Dynamique évolutive des souches de *B. pertussis* et la production de 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-) représentaient jusqu'en 2020 environ 50% des isolats collectés en France. Nous continuons donc à nous intéresser tout particulièrement à la dynamique évolutive des isolats vis-à-vis de la production de pertactine (PRN). En effet en 2023, nous observons que la totalité des 12 isolats collectés produisent la pertactine, ce qui représente une différence remarquable par rapport aux années précédentes. De plus, la majorité de ces isolats produisent FIM2 contrairement aux années précédentes.

Séquençage génomique complet et typage de *Bordetella* avec la technologie Oxford Nanopore R10

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 dont nous avons évalué les performances sur un set d'isolats de bordetelles de différentes espèces en comparaison avec les données Illumina.

Séquençage métagénomique de bordetelles directement à partir des prélèvements respiratoires – *adaptive sampling* avec la technologie Oxford Nanopore R10

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. La technologie envisagée repose sur un séquençage Nanopore

selon le protocole d'**adaptive sampling** permettant un enrichissement en temps réel des séquences lues par le séquenceur ciblant *B. pertussis*. Un premier essai prometteur a montré la faisabilité de cette approche pour le génotypage de *B. pertussis* à partir d'un ADN issu d'un prélèvement clinique. De nouveaux essais sont en cours incluant une étape de prétraitement destiné à éliminer un maximum d'ADN humain en amont du séquençage afin d'améliorer la couverture de séquençage. Après cette étape d'optimisation en cours début 2024, le CNR procédera ensuite à l'évaluation de la sensibilité de cette approche.

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

Le CNR 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 est en cours.

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).

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.

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

Les missions spécifiques du Centre National de Référence de la Coqueluche et autres bordetelloses (CNR), 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 éliminé du rapport public pour raisons de confidentialité ---

1.3 Locaux et équipements

--- Section éliminé 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 2934 isolats, dont 34 inclus de l'année 2023. 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 CNR 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 CNR, 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 CNR s'appuie sur le CIP 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* étudiée dans publication (comprenant 332 génomes du CNR) sont accessibles publiquement sur la plateforme BIGSdb (https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.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 CNR, la sensibilité aux anti-infectieux (ampicilline, céfalexine, streptomycine, érythromycine, azithromycine, clarithromycine, trimétoprime/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.

En 2023, nous avons également commencé le développement d'une nouvelle **PCR en temps réel pour la détection de la mutation 23sRNA conférant la résistance aux macrolides**, basée sur la publication de Kamachi *et al.* (https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/10/20-1035_article).

- **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. **Voir la section 2.1 pour plus de détails.**

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 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

Cette annexe figure dans un document PDF distinct