



RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2025

Année d'exercice 2024

CNR Coqueluche et autres bordetelloses

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

Résumé analytique - Faits marquants de l'année 2024	5
Executive summary - Highlights of the year 2024	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Mission et Organisation	7
Démarche Qualité	7
2. Activités d'expertise	10
2.1 Evolution des techniques	10
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	12
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	13
2.4 Collections de matériel biologique	14
2.5 Activités d'expertises	14
2.6 Activités de séquençage	17
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	19
3. Activités de surveillance	20
3.1 Description du réseau de partenaires	20
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	21
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	23
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	30
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	32
4. Alertes	35
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	36
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	36
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	37
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	37
5.4 Activité de Formation	37
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	39
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	39
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	44

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	48
8. Programme d'activité pour les années suivantes.....	49
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	50
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	50
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	51
1.3 Locaux et équipements	51
1.4 Collections de matériel biologique.....	51
1.5 Démarche qualité du laboratoire	51
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	52
2.1 Liste des techniques de référence	52
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	55
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques).....	56
4. Annexe 4 : Recensement des collections de matériels biologiques (non destinées à être rendues publiques)	56

Le CNR remercie le réseau de correspondants microbiologistes et cliniciens, et en particulier les membres du réseau REMICOQ et RENACOQ, du Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des hôpitaux, et les LBM 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. 2025. 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 2024

En 2024, la coqueluche a connu en France **une réémergence sans précédent**, avec **42 décès rapportés**, dont 23 enfants (20 âgés de moins de 1 an) et 19 adultes (dont 13 de 80 ans et plus) (<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-prevention-vaccinale/coqueluche/documents/bulletin-national/coqueluche-en-france.-bulletin-du-22-novembre-2024>). Le point culminant de cette résurgence **a été atteint au mois d'août**. Cette réémergence sans précédent a été marquée par une forte hausse du nombre d'échantillons adressés au Centre national de référence (CNR) de la Coqueluche et autres bordetelloses.

Au total, **1 430 échantillons ont été reçus**, soit **onze fois plus que l'année précédente**, traduisant une pression épidémiologique exceptionnelle. Sur l'ensemble de ces échantillons, 396 isolats de différentes espèces de *Bordetella* ont été caractérisés, dont une **majorité de *B. pertussis* (367 isolats, 93%)**, tandis que *B. parapertussis*, *B. holmesii* et d'autres espèces plus rares étaient moins représentés. Parallèlement, **le CNR a réalisé plus de 2 400 qPCR**, principalement pour la **détection de *B. pertussis***, dans le cadre de la surveillance épidémiologique pour confirmation de l'espèce grâce à des cibles spécifiques.

Les évaluations menées tout au long de cette flambée épidémique ont consolidé le rôle essentiel du CNR en tant qu'acteur central de la surveillance de la coqueluche en France. Le suivi et l'analyse des **souches de *B. pertussis*** (majoritairement **pertactine-positives et principalement FIM2**, contrairement à la période précédant la COVID-19), ainsi que la **mise en évidence de souches résistantes aux macrolides (MRBP)**, renforcent la pertinence de ce dispositif. Ces données confirment la nécessité d'une vigilance accrue et d'une capacité de réponse adaptable pour mieux anticiper et gérer les résurgences à venir.

Par ailleurs, le CNR a renforcé son **rôle de conseil et d'expertise auprès des autorités sanitaires (participation et relecture des documents produits par la HAS et le HCSP) et auprès des professionnels de santé**, grâce à un dispositif de contact élargi (adresse e-mail dédiée) et à la diffusion régulière des données de surveillance lors de réunions avec Santé publique France (SpF), la Direction générale de la santé (DGS) et les Agences régionales de santé (ARS). **Le CNR s'est également investi dans plusieurs actions de formation et de communication, tant au niveau national qu'international**, lui valant une reconnaissance accrue au plan international pour sa réactivité et son expertise pour la caractérisation des *Bordetella*. Enfin, son expertise en bio-informatique a consolidé sa capacité à accompagner et anticiper les évolutions épidémiologiques sur l'ensemble du territoire et à l'international. Deux articles scientifiques ont été coordonnés par le CNR, rendant compte de l'épidémie en France (<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.31.2400459> ; <https://doi.org/10.1101/2025.03.15.25324024>).

Face à l'ampleur de la crise, l'équipe du CNR s'est fortement mobilisée afin de maintenir des délais de réponse compatibles avec les enjeux de santé publique, malgré une charge de travail largement accrue par rapport aux précédentes vagues épidémiques de 2012-2013 et 2017-2018. **Cette situation a nécessité une réorganisation interne et un renfort ponctuel de personnel pour faire face aux demandes urgentes**. Malgré la pression exercée par l'épidémie, les standards de qualité (ISO15189) ont été respectés.

EXECUTIVE SUMMARY – HIGHLIGHTS OF THE YEAR 2024

In 2024, whooping cough (pertussis) experienced **an unprecedented resurgence in France**, with **42 reported deaths**, including 23 children (20 under the age of 1) and 19 adults (13 aged 80 or over) (<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-prevention-vaccinale/coqueluche/documents/bulletin-national/coqueluche-en-france.-bulletin-du-22-novembre-2024>). The **peak of this resurgence was reached in August**. This marked increase in cases was reflected in a sharp rise in the number of samples sent to the National Reference Centre (CNR) for Whooping Cough and other *Bordetella* infections.

In total, **1,430 samples were received—eleven times more than the previous year**—reflecting exceptionally high epidemiological pressure. Among these samples, 396 isolates from various *Bordetella* species were characterized, including a **vast majority of *B. pertussis* (367 isolates, 93%)**. *B. parapertussis*, *B. holmesii*, and other less common species were identified in smaller proportions. In parallel, the CNR **carried out over 2,400 qPCR** assays, mainly targeting *B. pertussis* for epidemiological surveillance and species confirmation through specific genetic targets.

Evaluations throughout this epidemic wave consolidated the CNR's essential role as the central actor for pertussis surveillance in France. The monitoring and analysis of *B. pertussis* strains—**primarily pertactin-positive and mostly FIM2**, in contrast to the pre-COVID-19 period—and the **emergence of macrolide-resistant strains (MRBP)**, underscore the relevance of this surveillance system. These findings confirm the need for heightened vigilance and adaptable response strategies to better anticipate and manage future outbreaks.

Moreover, **the CNR enhanced its advisory and expert roles with public health authorities (including participation in and review of documents produced by HAS and HCSP) and with healthcare professionals**, thanks to an expanded contact system (a dedicated e-mail address) and the regular dissemination of surveillance data in meetings with *Santé publique France* (SpF), the Direction Générale de la Santé (DGS), and the *Agences Régionales de Santé* (ARS). **The CNR also engaged in various training and communication actions at both national and international levels**, earning increased international recognition for its prompt responses and expertise in *Bordetella* characterization. Finally, its bioinformatics expertise has strengthened its ability to address and predict epidemiological changes both nationally and internationally. Two scientific articles coordinated by the CNR were published to document the outbreak in France (<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.31.2400459>; <https://doi.org/10.1101/2025.03.15.25324024>).

Faced with the scale of the crisis, the CNR team made extensive efforts to maintain turnaround times compatible with public health demands, despite a workload far exceeding those of earlier epidemic peaks in 2012–2013 and 2017–2018. **This situation required internal reorganization and additional personnel to handle urgent requests**. Despite the increased pressure, the team fully upheld quality standards (ISO 15189).

1. Missions et organisation du CNR

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 Pr 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 mais également par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation 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'ensemble des CNR/CIBU participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Dans le cas où cette organisation annuelle est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle afin de maintenir les compétences du personnel et du laboratoire ou une revue poussée des contrôles qualité interne comme peut l'indiquer la procédure générale de gestion des contrôles externes et internes des CNR de l'Institut Pasteur.

L'année Qualité 2024 s'est organisée comme suit :

Étapes clés LREMS	Périodes de réalisation
Revue qualité	23/04/2024
Revue de direction LREMS	24/06/2024
Audits internes qualité (AIQ) et technique (AIT)	AIQ : 18/12/2024 après-midi AIT : initialement prévue en juillet 2024, a été reportée à 2025 (28 mars 2025) en raison de l'épidémie nationale de coqueluche.
Audit de surveillance COFRAC	Pas d'évaluation en 2024

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 2025 :

Depuis 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 a été déployé tout au long de l'année 2024 et début d'année 2025 au sein des CNR.

Étapes clés LREMS	Prévision de réalisation
Revue qualité	18/03/2025 (réalisée)
Revue de direction LREMS	Juin-juillet 2025
Audits internes qualité et technique	AIT – 28/03/2025 AIQ - décembre 2025
Audit de surveillance COFRAC	14 – 18 avril 2025 sur les sites de Paris et Lyon

Participation du CNR à un Contrôle Qualité Externe

Conformément à la Norme ISO 15189, un contrôle externe de qualité (CEQ) doit être réalisé chaque année. En 2023, le CNR avait participé à deux programmes consacrés à l'identification moléculaire de *Bordetella pertussis* : QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, Glasgow, Scotland) en juin (QCMD 2023 *Bordetella pertussis* DNA EQA Programme – QAB094132_1 ; 10 échantillons), et d'INSTAND e.V. (Düsseldorf, Allemagne ; programme Bacterial Genome Detection – *Bordetella pertussis* – 532 ; 4 échantillons) en novembre. Les résultats ont été exacts pour l'ensemble des 14 échantillons (10 QCMD et 4 INSTAND), permettant au CNR d'obtenir un taux de réussite de 100 % en 2023. Le choix du programme INSTAND était motivé par sa localisation au sein de l'Union Européenne, facilitant la logistique d'envoi des échantillons, et a été retenue pour les futurs CEQ. En 2024, le contexte épidémique exceptionnel de coqueluche en France, conjugué à une surcharge d'activité et à un effectif réduit, a rendu impossible la participation au CEQ prévue (INSTAND). Le risque associé à cette absence est jugé faible : les précédentes participations ont toujours été conformes, et les contrôles internes de qualité (CIQ), effectués en continu, n'ont mis en évidence aucune dérive. Cependant, un essai inter-laboratoire complémentaire a été réalisé via l'analyse à l'aveugle de dix échantillons humains transmis par un laboratoire de Cerballiance dans le cadre de la validation de leur technique PCR pour la coqueluche. Après extraction de l'ADN, puis réalisation de qPCR ciblant l'IS481 et l'IS1001 (marqueurs très sensibles mais non spécifiques d'une espèce) et/ou d'autres gènes spécifiques d'espèce (*ptxA-Pr*, *h-IS1001* et *FLA*), le CNR a obtenu 100 % de résultats exacts, avec un taux de concordance global de 70 % entre Cerballiance et le CNR. Pour les trois échantillons discordants, le CNR a détecté l'ADN de *Bordetella* (qPCR IS481 positive, Ct compris entre 35 et 37), tandis que la technique du laboratoire Cerballiance ne l'a pas mise en évidence. Cette différence pourrait être liée à la sensibilité propre de chaque méthode, d'autant que les valeurs de Ct étaient déjà très élevées. Enfin, deux programmes CEQ (programme 532 INSTAND) sont déjà planifiés pour 2025 (juin et novembre), assurant la poursuite du suivi de la performance analytique du CNR.

Liste des examens de biologie médicale pratiqués par le CNR de la Coqueluche et autres bordetelloses

CNR	Famille	Sous famille	Activités de biologie médicale	Nb analyses 2023	Nb analyse 2024	Accrédité (A) ou Non Accrédité (NA)
CNR Coqueluche et autre bordetelloses	Microbiologie	Bactériologie	Détection d'ADN de <i>Bordetella</i>	184	436	A
			Identification de l'espèce de <i>Bordetella</i> par PCR en temps réel (cibles spécifiques d'espèce)	148	1480	NA
			Identification de souches de <i>Bordetella</i>	34	399	NA

2. Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est donnée en **Annexe 2**. Le CNR est le laboratoire de référence national pour **l'identification ou la confirmation moléculaire des différentes espèces de bordetelles**. Les demandes d'isolement, de vérification, de mise en culture ou de confirmation de l'espèce de *Bordetella* détectée chez un patient proviennent principalement de laboratoires hospitaliers et du secteur privé (laboratoires de biologie médicale, LBM). En cas de signalement par l'Agence Régionale de Santé (ARS) de cas groupés de coqueluche dans une collectivité, en lien avec Santé publique France (SpF), le CNR apporte son expertise en vérifiant l'espèce de *Bordetella* responsable de l'infection.

En 2024, le CNR a **mis en place la qPCR 23S afin de détecter la mutation A2047G dans le gène codant l'ARN 23S**, associée de manière causale à la **résistance aux macrolides chez *B. pertussis***, et a également **renforcé la mise en culture** (incitation et support aux laboratoires partenaires pour la mise en culture de *Bordetella*, et pour ceux qui n'étaient pas en capacité de la mettre en place, le CNR a proposé l'envoi de leurs prélèvements respiratoires au CNR pour mise en culture).

En 2024, le CNR a reçu **1430 échantillons humains** correspondant à 1400 cas cliniques (30 doublons), enregistrant ainsi **une hausse de 1017 % par rapport à 2023 (n= 128 échantillons)**. Cette **très forte recrudescence de la coqueluche à *B. pertussis*** s'est traduite par un recours accru à la mise en culture, laquelle représente en 2024 près de **35% de l'activité du CNR**.

2.1 Evolution des techniques

Depuis 2022, le CNR s'appuie sur la plateforme BIGSdb (<https://bigsdb.pasteur.fr/bordetella/>) pour le génotypage de routine des souches de Bordetelles. Les différents schémas de typage accessibles sur cette plateforme (Bridel, Bouchez et al., Nat Commun, 2022) permettent : **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)**. Grâce à une nomenclature unifiée des souches et des variants alléliques de *B. pertussis*, le CNR peut ainsi réaliser un suivi des souches émergentes au niveau national et international.

En 2024, nous avons finalisé le développement d'une nouvelle PCR en temps réel (qPCR) pour détecter la mutation A2047G dans le gène codant pour l'ARN ribosomique 23S, responsable de la résistance aux macrolides chez *B. pertussis*, en nous appuyant sur la publication de Kamachi et al. (https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/10/20-1035_article). Nous avons adapté cette méthode à la chimie TaqMan ainsi qu'à notre thermocycleur LightCycler 480 (version II, Roche Diagnostics). Cette qPCR cible deux allèles du gène codant l'ARNr 23S de *B. pertussis* (présent en trois copies par génome), permettant de différencier l'allèle

sensible (A à la position 2047) de l'allèle résistant (G à la position 2047). Deux sondes fluorescentes sont utilisées : l'une marquée avec FAM pour l'allèle sensible et l'autre marquée avec HEX pour l'allèle résistant, toutes deux reconnaissant spécifiquement un fragment de 123 pb du gène codant pour l'ARNr 23S. Cette approche nous permet de distinguer directement, à partir de l'ADN extrait d'un prélèvement respiratoire, les isolats de *B. pertussis* sensibles aux macrolides de ceux qui y sont résistants. Enfin, la qPCR est réalisée uniquement sur des échantillons respiratoires ayant déjà donné un résultat positif pour la toxine pertussique (qPCR-PTa, une copie par génome). Étant donné que le nombre de copies est similaire, la sensibilité analytique est comparable, bien que les limites de détection soient encore en cours de détermination.

Le protocole a été publié sur protocols.io ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3q4y1v25/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3q4y1v25/v1)) et diffusé au sein du réseau international EupertStrain, qui l'a vivement apprécié. Au total, en 2024, **nous avons testé 544 prélèvements respiratoires positifs en qPCR-PTa et détecté 4 échantillons cliniques (0,7 %) portant la mutation A2047G chez *B. pertussis*, donc résistants aux macrolides.**

Le CNR a commencé le développement et l'optimisation d'un **protocole ELISA pour la détection des antigènes vaccinaux de *B. pertussis*** (PT, FHA, PRN, FIM-2 et FIM-3), remplaçant les méthodes précédentes (d'immunoempreinte, Western blot) et permettant d'harmoniser les méthodes avec celles d'autres laboratoires européens. Le protocole de référence de l'ECDC a servi de base et a été optimisé en interne (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/bordetella-pertussis-laboratory-diagnosis-molecular-surveillance.pdf>).

Outre l'harmonisation technique au niveau européen, le passage de la technique d'immunoempreinte (actuellement utilisée par le CNR) à l'ELISA pour la détection des antigènes vaccinaux de *B. pertussis* présente plusieurs avantages, notamment la possibilité de réaliser une semi-quantification simple et rapide de ces antigènes. À ce jour, notre technique ELISA est optimisée et validée pour la détection de PT, FHA, FIM-2 et FIM-3, mais pas encore pour PRN, en raison de réactions non spécifiques observées avec l'anticorps préconisé par l'ECDC (NIBSC 97/558). Le CNR va prochainement tester de nouveaux anticorps du NIBSC pour la détection de la PRN. Une fois ces ajustements finalisés et la méthode validée pour PRN, le CNR abandonnera l'immunoempreinte au profit de l'ELISA.

La surveillance de l'agent de la coqueluche repose sur leur caractérisation microbiologique génomique et cette activité nécessite d'avoir réussi à isoler la bactérie. Or, une diminution du recours à la culture microbiologique de *B. pertussis* et *B. parapertussis*, les agents responsables de la coqueluche, avait été observée les années précédentes dans les laboratoires de microbiologie hospitaliers. En effet, l'isolement de Bordetelles nécessite une expertise technique et des milieux spécialisés (Bordet-Gengou, Regan-Lowe), ce qui complique leur intégration dans les processus d'accréditation en biologie médicale. Par conséquent, de moins en moins de laboratoires pratiquent cette méthode, d'autant plus que le diagnostic de la coqueluche peut désormais être réalisé plus facilement par biologie moléculaire. Afin de contrecarrer cette tendance, et parce que la culture reste pour l'instant le seul moyen d'étudier l'évolution des populations de *B. pertussis* et de *B. parapertussis*, **une communication régulière a été instaurée en 2023 pour aider les laboratoires à maintenir leur propre capacité de culture.** Cette initiative inclut le partage de protocoles, de références de milieux de culture et de

souches contrôles (voir section 2.3). Elle s’est intensifiée en 2024 à l’occasion de l’épidémie nationale de **coqueluche** : de nombreux laboratoires se sont remis à la culture, entraînant un nombre exceptionnel de souches reçues cette année-là (n=226) (voir tableau ci-dessous). Le CNR a également encouragé et conseillé ses laboratoires partenaires qui n’étaient pas en mesure de mettre en place la culture, en leur proposant d’envoyer leurs prélèvements respiratoires dans des conditions adéquates, afin que le CNR procède à la mise en culture. En 2024, le CNR mis en culture 395 prélèvements respiratoires, soit 35 % des prélèvements reçus et traités cette année-là. Le taux de réussite avoisine 38 %, ce qui a permis la récupération de 147 souches de *B. pertussis* et 3 de *B. parapertussis*. **Au total, le CNR a donc analysé un total de 370 isolats de *B. pertussis* (sans exclure les doublons cliniques, n=3) et 6 de *B. parapertussis* (voir tableau ci-dessous)**. En raison de l’ampleur de l’épidémie de 2024, le CNR n’a toutefois pas encore pu traiter tous les prélèvements respiratoires reçus dans le cadre de sa collaboration avec Cerba et Eurofins-Biomnis : 301 d’entre eux sont encore en attente de mise en culture et seront traités en 2025.

Tableau : Nombre d’échantillons mis en culture au CNR et nombre d’isolats reçus au CNR entre 2017 et 2024

Année	Mise en culture par le CNR			Souches remontées au CNR
	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	395	150 (38%)	147 <i>B. pertussis</i> 3 <i>B. parapertussis</i>	223 <i>B. pertussis</i> 3 <i>B. parapertussis</i>

Période Covid-19 indiquée en gris

2.2 Travaux d’évaluation des techniques, réactifs et trousses

En 2024, le CNR n’a pu évaluer aucune technique, réactif ou trousse pour le diagnostic de la coqueluche. Dans le cadre d’un essai inter-laboratoire avec Cerballiance, dix échantillons ont été testés pour valider leur PCR de diagnostic de la coqueluche. Le CNR a obtenu 100 % de résultats exacts et une concordance globale de 70 % avec Cerballiance. Les quelques divergences observées (valeurs de Ct très élevées pour IS481) peuvent être liées

à une différence de sensibilité entre les méthodes (voir section 1 – Démarche Qualité).

La pandémie de COVID19 a accéléré l'émergence de nouvelles techniques moléculaires et de nouveaux kits de diagnostic pour les infections respiratoires, dont des PCR syndromiques multiplex. Ces avancées permettent de détecter simultanément plusieurs agents pathogènes et ont suscité un intérêt accru pour l'évaluation comparative des différents outils disponibles. En mars 2024, lors de notre réunion avec le réseau REMICOQ, nous avons donc évoqué la possibilité de lancer un programme d'évaluation externe de la qualité (EQA) dans différents laboratoires de biologie médicale en France. L'objectif serait d'évaluer la performance des kits de biologie moléculaire disponibles sur le marché pour le diagnostic de la coqueluche, notamment ceux bénéficiant des récentes avancées techniques. Il a été convenu que le CNR serait responsable d'élaborer une enquête préliminaire sur les différents kits utilisés, de préparer un panel de 6 à 10 échantillons ainsi que de collecter et d'analyser les résultats obtenus. Ce programme permettrait de comparer les performances des différentes méthodes de détection de *B. pertussis* et *B. parapertussis*, y compris les nouvelles PCR syndromiques multiplex, et de renforcer la fiabilité des résultats. Toutefois, nous prévoyons de le mettre en place à partir du second semestre 2025 ou début 2026, en collaboration étroite avec les laboratoires participants du réseau REMICOQ (voir section 3.4).

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

En 2023, nous avons commencé l'adaptation et le développement d'une nouvelle qPCR pour détecter la mutation A2047G du gène codant pour l'ARNr 23S de *B. pertussis*, responsable de la résistance aux macrolides. La mise en place effective de cette méthode a eu lieu en 2024. Le protocole, adapté au thermocycleur LightCycler 480 (version II, Roche Diagnostics) et au système TaqMan, a été publié sur protocols.io ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3q4y1v25/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3q4y1v25/v1)) et partagé au sein du réseau international EupertStrain. Inspirée de la publication de Kamachi et al., cette approche distingue en une seule réaction l'allèle sensible (A2047) de l'allèle résistant (G2047), permettant ainsi d'identifier directement, à partir de l'ADN extrait d'un prélèvement respiratoire contenant *B. pertussis*, il est possible de déterminer directement si la souche porte la mutation conférant la résistance aux macrolides et, par conséquent, de prédire si elle est sensible ou non. Pour plus de détails, se référer à la section 2.1.

Nous envoyons les modes opératoires décrivant les diagnostics de référence (culture ou qPCR) aux laboratoires hospitaliers ou LBM qui en font la demande. En 2024, 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 de bactériologie du réseau REMICOQ et autres (voir section 2.1). Les différentes actions identifiées pour aider à poursuivre la mise en culture des bordetelles ont été mises en place début janvier 2023 et renforcé en 2024: i) diffusion du mode opératoire pour la mise en culture des *Bordetella*; ii) envoi des références des milieux commerciaux (Bordet-Gengou et Regan-Lowe) approuvés par le CNR (aussi disponible sur notre site web), 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 2024, le CNR a stocké 399 isolats (doublons inclus, n= 3) décrits dans la **section 2.5.1**. Pour plus de détails, voir l'annexe 4.

Distribution de souches

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.

LE CNR a envisagé, en 2024, de collaborer avec la CIP afin de constituer un panel plus étendu de souches de *Bordetella*, mais en raison de l'épidémie, ce projet a été reporté. Toutefois, nous avons déposé dans la collection CIP la première souche résistante aux macrolides détectée en France en 2011 (**FR4991 - CIP112499**, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22608348/>), afin qu'elle puisse être distribuée à la communauté et utilisée comme contrôle pour la qPCR 23S ainsi que pour la réalisation d'antibiogrammes. Pour plus de détails, voir l'annexe 4.

2.5 Activités d'expertises

2.5.1 Nombre d'échantillons cliniques reçus et analysés au CNR en 2024

Pour l'année 2024, nous avons reçus au total **1430 échantillons cliniques** repartis de la façon suivante :

- **249 isolats** de *Bordetella* spp., déjà isolés pour lesquels nous avons confirmé l'identification.
- **56 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*.
- **1122 prélèvements respiratoires** :
 - **426** sur lesquels des PCR ont été réalisées afin de vérifier la présence de l'ADN de *Bordetella* et/ou identifier l'espèce de *Bordetella*.
 - **150** ayant donné lieu à une **culture positive** (parmi lesquels 70 avaient fait l'objet d'une qPCR avant la culture).
 - **141 non cultivables**, mais identifiés comme *Bordetella* par PCR.
 - **104 non cultivables** sans PCR réalisée au CNR.
 - **301** reçus dans le cadre de notre collaboration avec Cerba et Eurofins-Biomnis, **en attente de mise en culture** (prévue pour 2025).
- **2 souches inexploitable**s (arrivés contaminés).
- **1 prélèvement respiratoire inexploitable** (tube arrivé vide au CNR).

Au total, les échantillons humains reçus (n = 1430) correspondaient à 1400 cas cliniques (30 doublons cliniques). De manière générale, l'année 2024 a été marquée par une **très forte recrudescence de la coqueluche à *B. pertussis* à l'échelle nationale, comme en témoigne le nombre d'échantillons reçus au CNR**. En effet, le CNR a observé une augmentation de 1017 % par rapport à 2023 dans le nombre d'échantillons biologiques envoyés au CNR (44 en 2021 ; 100 en 2022 ; 128 en 2023 ; **1430 en 2024**).

Analyses réalisées au CNR

Type d'échantillon	Type d'analyse	Délai de rendu des résultats	Nombre d'analyses ¹
Isolats bactériens	Identification de l'espèce par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ou par séquençage génomique (en cas d'une nouvelle espèce)	< 10 jours ouvrées < 28 jours ouvrées	396
	Antibiogrammes	Non applicable ²	396
	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	396
	Vérification de la production des protéines vaccinales déterminants de virulence (PT, FHA, PRN, FIM-2, FIM-3)	Non applicable	373 ³
Prélèvements respiratoires	Mise en culture	< 15 jours ouvrées	395
Prélèvements respiratoires et ADN extraits	Confirmation de l'identification moléculaire du genre <i>Bordetella</i> par PCR en temps réel (cibles IS481/IS1001) ⁴	< 10 jours ouvrées	436
	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>)	< 10 jours ouvrées	1480
	Détection de la mutation que confère la résistance aux macrolides (qPCR 23S) ³	Non applicable	540

¹ hors doublons ; ² Après l'émergence d'une souche de *B. pertussis* résistante aux macrolides en février 2024, le résultat de l'antibiogramme relatif à la détection de cette résistance chez *B. pertussis* est fourni à nos correspondants. L'antibiogramme, réalisé par diffusion en gélose (Müller-Hinton au sang de cheval, incubation à 35-36 °C, lecture à 48-72 h), est interprété selon les recommandations PK-PD du CA-SFM 2013. En cas de résistance, des E-tests sont utilisés pour confirmer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Ce résultat est donné à titre indicatif, car la technique de l'antibiogramme n'est pas accréditée au CNR ; ³Réalisé uniquement pour *B. pertussis*; ⁴ Techniques accréditées au CNR.

Face à l'épidémie nationale de coqueluche survenue en France en 2024, le nombre d'isolats bactériens analysés au CNR, en particulier de *B. pertussis*, a considérablement augmenté, **avec 12 fois plus d'isolats examinés par rapport à l'année précédente** (34 en 2023). On note également une hausse marquée du nombre

de PCR réalisées par le CNR, notamment pour l'identification d'espèce (Pta et h-IS1001, permettant de distinguer *B. pertussis* de *B. holmesii*), principalement entre mars et septembre 2024.

2.5.2 Nombre d'isolats cliniques reçus ou isolés au CNR en 2024

Les détails du nombre d'isolats, isolés ou reçus pour confirmation de l'identification au CNR en 2024, sont présentés dans le **Tableau** ci-dessous :

Tableau : Nombre d'isolats reçus ou isolés au CNR en 2024

Source	Espèce	2024 ¹
RENACOQ		
	<i>B. pertussis</i>	239
	<i>B. parapertussis</i>	4
HORS RENACOQ (dont Col.BVH, LBM)		
	<i>B. pertussis</i>	128
	<i>B. parapertussis</i>	2
	<i>B. holmesii</i>	10
	<i>B. hinzii</i>	5
	<i>B. petrii</i>	3
	<i>B. bronchiseptica</i>	2
	<i>B. trematum</i>	1
	<i>Bordetella genome species 1</i>	1
	<i>Bordetella genome species 4</i>	1
TOTAL		396

¹ hors doublons.

2.5.3 Nombre de qPCR réalisées en 2024

Le nombre de qPCR effectuées par le CNR en 2024 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), ou dans le cadre d'expertise nationale.

Tableau : Nombre de qPCR réalisées en 2024

Type de PCR	Nombre Total	IS481#	IS1001#	PTa (promoteur de la toxine de pertussis)	h-IS1001	Fla (flagelline)	BP3385 (Bp)	23S ARNr
Surveillance nationale	2258	187	193	629	629	44	67	509
Demande des ARS lors de cas groupés	157	22	22	37	36	6	8	26
Expertise nationale - essaie interlaboratoire	41	6	6	10	10	4	0	5
Total	2456	215	221	676	675	54	75	540

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 et collabore avec la plateforme Biomix pour l'accès au Gridlon.

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 Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur de l'Institut Pasteur (CRBIP), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données brutes sortantes de P2M. 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 l'analyse des polymorphismes de type single-nucleotide à l'échelle du génome complet (<i>whole-genome Single-Nucleotide Polymorphism</i>, wgSNP) chez <i>B. pertussis</i>, nous utilisons la méthode décrite par Lefrancq et al. (https://zenodo.org/records/6335548). 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 disponibles sur BIGSdb, ainsi que la méthode wgSNP pour <i>B. pertussis</i> , nous permettent de tester l'hypothèse que certaines souches sont reliées épidémiologiquement (cas groupés), de surveiller l'émergence de lignées particulières et de détecter l'apparition de souches de <i>B. pertussis</i> résistantes aux macrolides.

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, Flye pour données ONT) 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. parapertussis* ne produisant pas cet antigène (PRN-). Nous avons ainsi constitué une base de données génomiques pour les isolats de *B. pertussis* PRN-.

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

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

Ces analyses génomiques sont réalisées systématiquement.

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

367 souches de *B. pertussis*.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

396 souches de *Bordetella*. Aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues ou isolées au CNR).

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 (séquences brutes) sont alors déposés dans ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) et les fichiers fasta (génomes assemblés) sur BIGSdb.

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 la plateforme BIGSdb-Pasteur (<https://bigsdbs.pasteur.fr/bordetella/>).

Les génomes assemblés de 2024 sont stockés dans notre plateforme BIGSdb-Pasteur ; en 2024, 396 séquences ont été introduites. Elles sont partagées à des fins de santé publique ou avec nos collaborateurs, et, le cas échéant, lors de chaque publication.

3. Activités de surveillance

L'année 2024 a été marquée par une **résurgence très importante de la coqueluche due à *B. pertussis***, avec plus de 40 décès rapportés par Santé publique France (SpF), dont 20 nourrissons, dressant un bilan particulièrement lourd et plaçant le CNR au cœur d'une situation épidémique exigeante. Malgré de nombreux défis, le CNR a su répondre de manière réactive et coordonnée. Sur le plan de la surveillance, le CNR a confirmé l'intense circulation de *B. pertussis* et s'est démarqué à l'échelle européenne grâce à son rôle de pionnier dans la caractérisation des souches en circulation. **Celles-ci, pour la plupart productrices de pertactine (PRN) et de fimbriae 2 (FIM-2)**, se révèlent différentes de celles identifiées pendant la période COVID (50 % PRN négatives et majoritairement FIM-3). Par ailleurs, **le CNR a fait preuve d'une grande vigilance face à l'émergence de souches résistantes aux macrolides (MRBP), qui se distinguent par un profil PRN négatif**. Cet épisode a souligné à quel point l'expertise et la confirmation microbiologique apportées par le CNR sont essentielles pour valider tout signal épidémique et orienter les mesures de santé publique.

Au-delà de la surveillance, le CNR a été **fortement sollicité pour informer les professionnels de santé, les autorités sanitaires et même le grand public via différents canaux, y compris les médias**. Cette forte demande d'information consolide le rôle de référence du CNR, tant au niveau national qu'international. **L'année 2024 a ainsi permis de renforcer les collaborations, de perfectionner les outils de diagnostic et de surveillance, et de réaffirmer l'expertise du CNR dans la surveillance de la coqueluche en France.**

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 2024, nous avons reçu **1430 échantillons biologiques** qui proviennent essentiellement de :

- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. paraptussis* et dont les échantillons sont collectés par les cliniciens du réseau RENACOQ (n=535 ; 37 %) ;
- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. paraptussis* et dont les échantillons sont collectés par les cliniciens hors réseau RENACOQ, surtout par les bactériologistes du Col.BVH (n=381 ; 27 %) ;
- ✓ Patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (par exemple crèche, établissements scolaires, collectivités type EHPAD) – demandes ARS (n=43 ; 3 %) ;
- ✓ Patients infectés par *B. pertussis* ou *B. paraptussis* et dont les échantillons sont collectés par les LBM (surtout Cerba et Eurofins-Biomnis) et envoyés pour la mise en culture ou confirmation d'espèce par qPCR (n=447 ; 31 %) ;
- ✓ Patients infectés par *B. holmesii*, *B. bronchiseptica* ou par d'autres espèces de *Bordetella* et envoyés, le plus souvent, par les bactériologistes du Col.BVH (n=24 ; 2 %).

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1. Surveillance moléculaire de *Bordetella*

La **figure ci-dessous** illustre l'évolution du nombre de PCR et de sérologies réalisées entre 2006 et 2024. En 2024, on constate une **très forte augmentation du nombre de PCRs réalisés au CNR**, atteignant un niveau jamais observé depuis le début de l'activité du CNR. Ce phénomène reflète le caractère cyclique de la coqueluche (pics d'incidence tous les 3 à 5 ans) et témoigne d'une **recrudescence sans précédent de coqueluche à *B. pertussis* en 2024**. A noter que ce décompte inclut les 540 qPCR 23S effectuées en 2024, ce qui renforce encore la hausse observée dans le nombre de PCR réalisées au CNR.

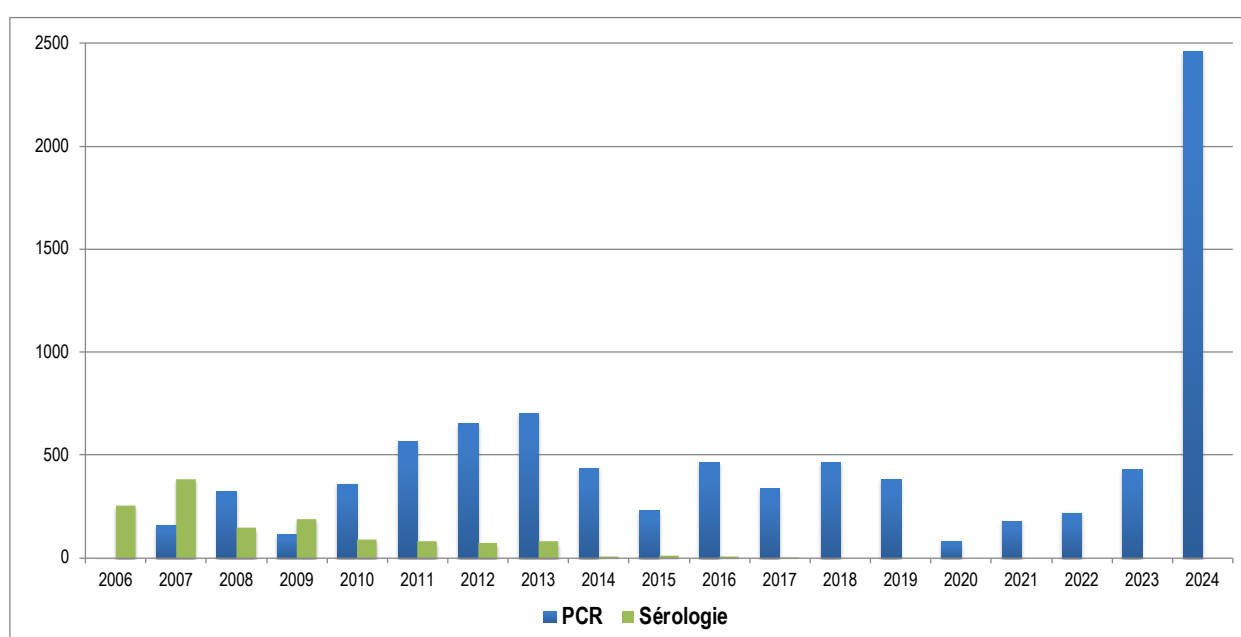


Figure. Nombre de PCR et de sérologies réalisées par le CNR entre 2006 et 2024

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.

Parmi les **690 prélèvements respiratoires ou ADN extraits analysés par PCR en 2024**, nous avons obtenu (hors doublons) :

- **527 PCR positives à *B. pertussis*** (âge moyen : 4 ans, écart-type : 24 ans, données disponibles n=515). Parmi les cas documentés (n=324), 27 % ont été hospitalisés, dont **16 % en réanimation** et 16 % en pédiatrie. La toux est présente dans 99,7 % des cas (données disponibles n=352). Par ailleurs, 11 cas portent sur les DOM : 1 à Cayenne, 9 en Nouvelle-Calédonie et 1 en Guyane.
- **5 PCR positive à *B. paraptussis*** (chez 3 nourrissons âgés de moins de 5 mois et un adulte de 25 ans).

- **3 PCR positive à *B. holmesii*** (chez des enfants âgés de 10 à 17 ans).
- **8 PCR positive à *B. pertussis* et *B. paraptussis*** (chez des enfants âgés de 1 à 6 ans).
- **5 PCR positive à *B. pertussis* et *B. holmesii*** (chez 1 nourrisson de 1 mois, 3 enfants âgés de 13 à 18 ans et 1 sénior de 75 ans).
- **110 PCR positives à *Bordetella*** – 104 IS481, 2 IS1001 positives et 4 IS481+IS1001 positives pour lesquelles l'espèce n'a pas pu être précisée. Parmi les **104 cas positifs à IS481**, l'âge moyen est de 14 ans (écart-type : 21 ans ; données disponibles : n=100). Cela suggère une tendance à une consultation tardive dans cette population, entraînant un résultat positif à IS481 mais négatif à PTa. Par ailleurs, deux cas provenaient des DOM : l'un à Papeete et l'autre à La Réunion.
- **32 PCR négatives à *Bordetella*.**

Enfin, on observe un **nombre conséquent de co-infections détectées** (n=17, soit environ 3 % des cas), phénomènes relativement rares, témoignant d'une circulation active de *B. pertussis* ainsi que d'autres espèces (*B. holmesii* et *B. paraptussis*).

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**. Même si l'on distingue les cycles épidémiques typiques de coqueluche (tous les 3 à 5 ans), il ne s'agit pas d'une courbe épidémiologique et ces données doivent être interprétées avec prudence, d'autant que plusieurs laboratoires de bactériologie ont cessé de cultiver *Bordetella* ces dernières années.

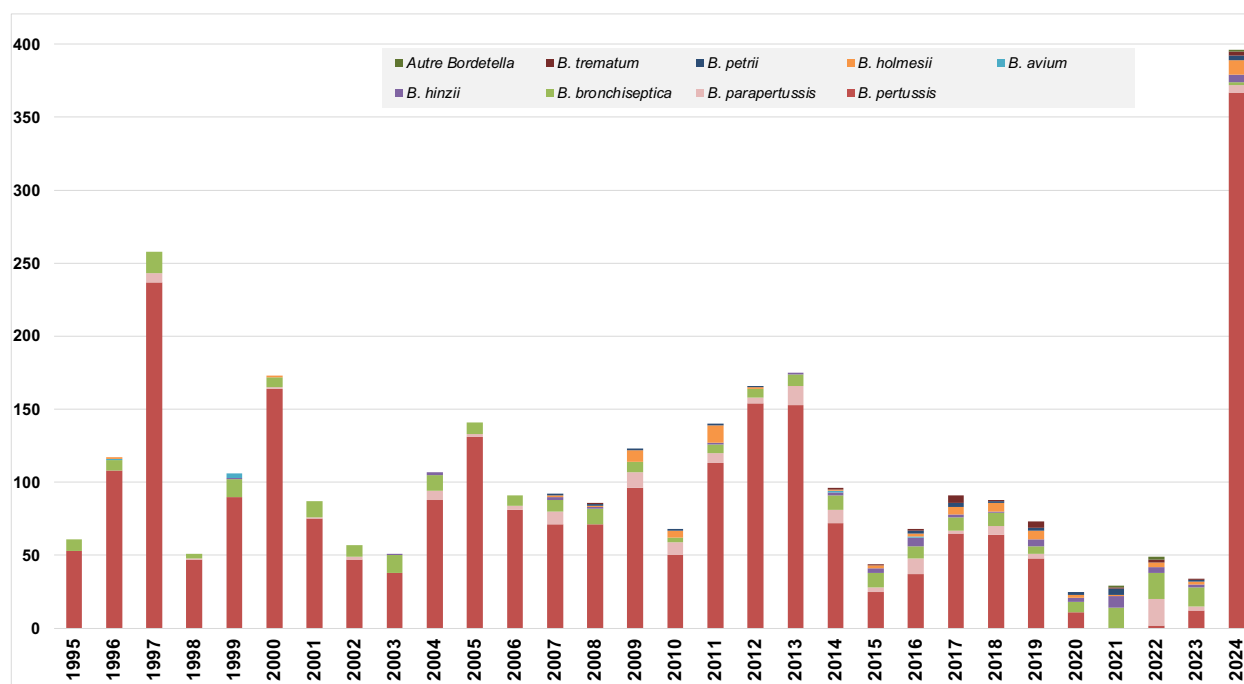


Figure. Répartition des isolats de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1995

Alors qu'en 2022 et 2023, le nombre d'isolats traités au CNR demeurait relativement faible (49 puis 34), l'année 2024 se caractérise par une hausse très marquée, avec **396 isolats reçus ou cultivés au CNR** (hors doublons). Parmi

ceux-ci, *B. pertussis* (n = 367) est devenue **très largement majoritaire (93 %)** en 2024, alors qu'elle ne représentait que 35 % des isolats en 2023 et 4 % en 2022, confirmant ainsi la recrudescence de la coqueluche à *B. pertussis* en 2024. *B. paraptussis* reste minoritaire en 2024 (1,5 %). Parmi les autres espèces, on observe une augmentation de *B. holmesii* (10 isolats en 2024 contre 2 en 2023) et une diminution de *B. bronchiseptica* (2 isolats en 2024 contre 13 en 2023).

3.2.3. Diversité phylogénétique des souches isolées ou cultivées au CNR en 2024

La diversité des 29 souches de *Bordetella* (en excluant *B. pertussis*) analysées au CNR en 2024 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) ; avec les carrés bleus qui représentent les génomes des isolats reçus ou cultivés au CNR en 2024.

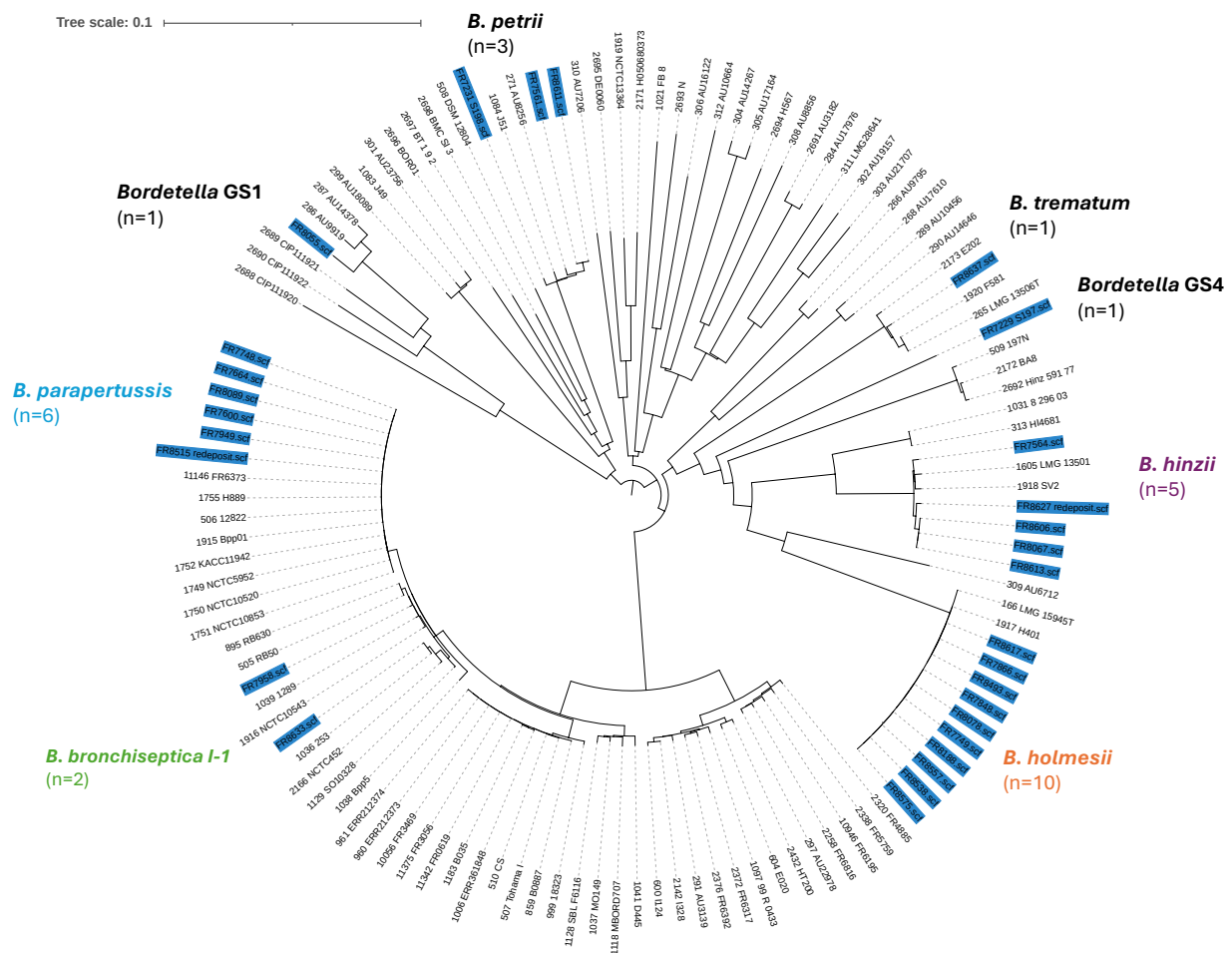


Figure. Arbre phylogénétique déduit de l'analyse génomique des 29 isolats (en bleu) de *Bordetella* reçus au CNR en 2024 (en excluant *B. pertussis*)

En bleu : 6 *B. paraptussis*, vert : 2 *B. bronchiseptica*, orange : 10 *B. holmesii*, violet : 5 *B. hinzii*

En noir, les autres *Bordetella* : 1 *B. trematum*, 3 *B. pertussis*, 1 *Bordetella genome species 1*, 1 *Bordetella genome species 4*

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 ci-dessous**. Cette tendance reflète l'épidémiologie cyclique de la coqueluche (sur des périodes de 3 à 5 ans), mais doit être interprétée avec prudence, car plusieurs laboratoires ont cessé de cultiver *Bordetella* ces dernières années. Les derniers cycles épidémiques observés en France couvrent approximativement les périodes 2011-2014 et 2016-2019, avec des pics entre 2012-2013 et 2017-2018.

En 2023, le CNR avait déjà constaté une multiplication par six du nombre d'isolats de *B. pertussis* (par rapport aux deux isolats de 2022), laissant déjà supposer une résurgence de la coqueluche due à *B. pertussis*. Cette tendance s'est confirmée en 2024 de manière très nette : **le nombre d'isolats reçus ou cultivés au CNR y est 31 fois plus élevé qu'en 2023 (n=367), un niveau inédit depuis la création du CNR.**

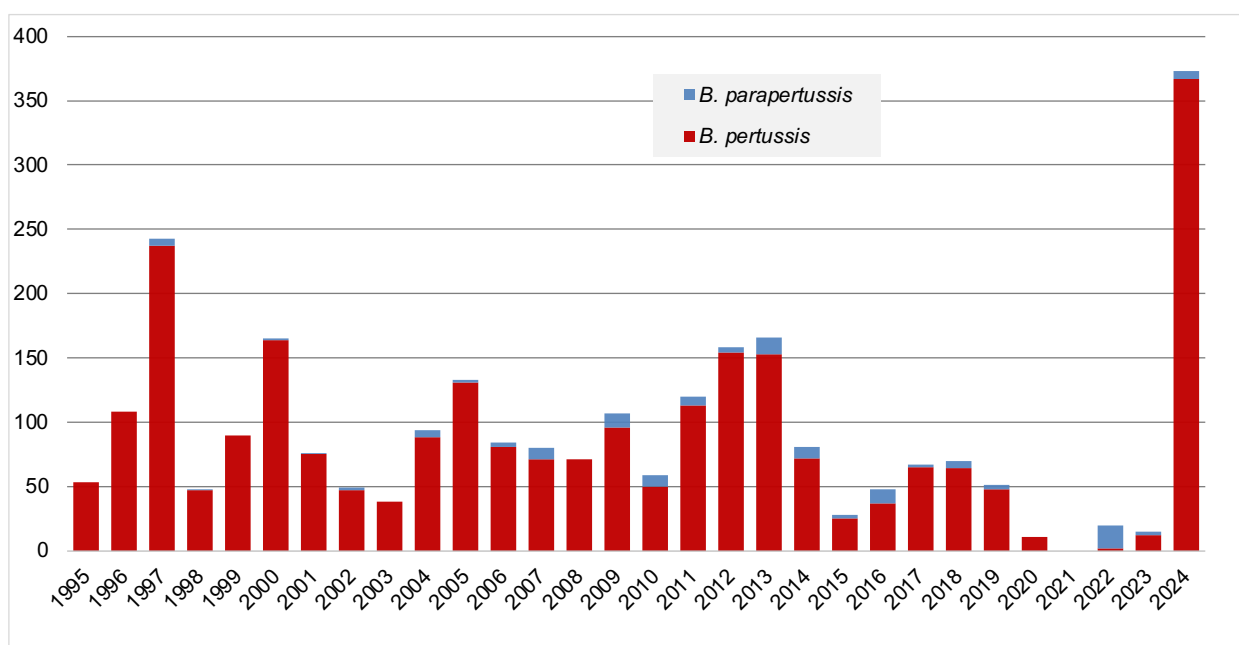


Figure. Répartition des isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus ou isolés au CNR entre 1995 et 2024

1. *B. pertussis*

En 2024, **367 isolats de *B. pertussis* ont été reçus et/ou isolés au CNR**. La majorité (65 %) provenait des bactériologistes du réseau RENACOQ, 26 % d'autres sources (hors RENACOQ ou COL. BVH) et 8 % de laboratoires de biologie médicale privé (principalement Cerba et Eurofins-Biomnis).

L'âge moyen des patients concernés (données disponibles : n=362) était de **11 ans** (écart-type : 21 ans ; âge médian : 2 ans). Parmi les cas documentés (n=185), **34 % ont nécessité une hospitalisation**, dont 13 % en réanimation et 27 % en pédiatrie. **L'âge médian des patients hospitalisés était de 4 mois, soit une population pas encore protégée par la vaccination** (68 % avaient moins de 12 mois).

✓ **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 2024, **95 %** des souches analysées **sont de type *ptxP3***, tandis qu'on observe une réintroduction du type ***ptxP1* (5 %** des isolats).

✓ **Allèles du gène codant la sous-unité S1 de la toxine PT.** En 2024, toutes les souches de *B. pertussis* possèdent un allèle du gène codant la sous-unité S1 de la toxine pertussique de type ***ptxA1***, à l'exception d'un isolat qui présente l'allèle *ptxA45*.

- **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 PRN 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 2024, **contrairement à la période 2016-2020, 96% des souches reçues étaient PRN+**.

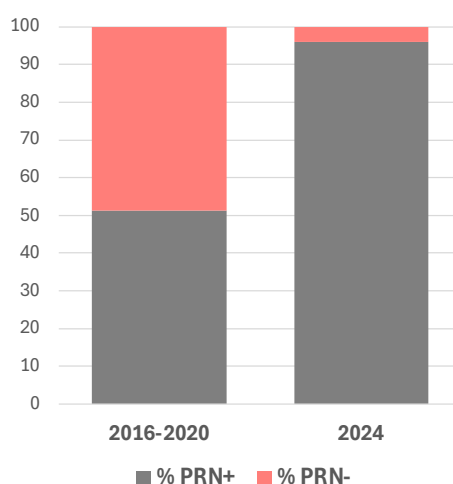


Figure. Répartition des isolats de *B. pertussis* reçus ou isolés au CNR produisant ou non la pertactine entre 2016-2020 et 2024

- **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 2016-2020, les isolats produisent majoritairement la protéine fimbriale FIM3 (**voir figure ci-dessous**). En 2024, **76% des isolats produisent FIM2**.

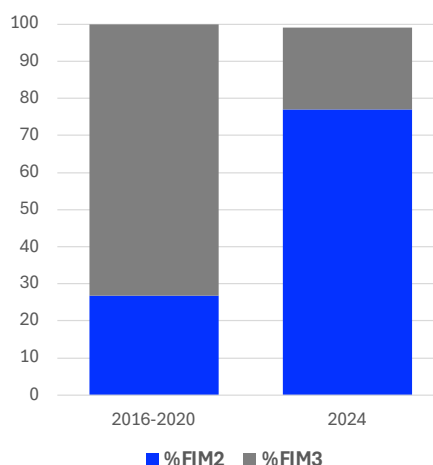


Figure. Répartition des isolats de *B. pertussis* reçus ou isolés au CNR produisant FIM-2 ou FIM-3 entre 2016-2020 et 2024

✓ **Allèles de *fim2* et *fim3*** : Parmi les isolats *ptxP3* identifiés en 2024, **70 %** présentent un profil ***fim2-1/fim3-1*** (BpAg-ST4) et **22 %** un profil ***fim2-1/fim3-2*** (BpAg-ST9). Pour les isolats *ptxP1*, 60 % sont de type ***fim2-1/fim3-26***, une lignée également observée dans d'autres pays européens en 2024 (Pays-Bas et Royaume-Uni).

- **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 2023 nous avons identifié au total 5 isolats FHA-négatifs. En 2024, **99,7 % des souches de *B. pertussis* produisent la FHA** : une seule souche FHA négative a été identifiée.

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 que nous avons reçu et/ou isolé 18 isolats de *B. paraptussis* en 2022 et 3 en 2023, **6 isolats ont été isolés en 2024**. Ces six isolats représentaient quatre cas cliniques provenant du réseau RENACOQ, incluant trois nourrissons de moins de 4 mois et un enfant âgé de 6 ans. Les deux autres cas concernaient un enfant de 5 ans et un adulte de 35 ans.

Surveillance de l'évolution des antigènes

- **PERTACTINE** : Il est important de noter que 99 % (87 sur 88) des isolats de *B. paraptussis* circulant en France entre 2007 et 2021 ne produisaient pas la pertactine. La situation a changé en 2022, lors de l'épidémie de coqueluche à *B. paraptussis* (Bouchez et al., J Med Microbiol. 2024), où seulement 28 % (5 sur 18) des isolats ne produisaient pas la PRN. En 2024, **5 des 6 isolats analysés produisent la PRN**. Le seul isolat PRN- présente une délétion caractéristique (delG-1895) dans le gène codant cette protéine.

3.2.5. Surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche

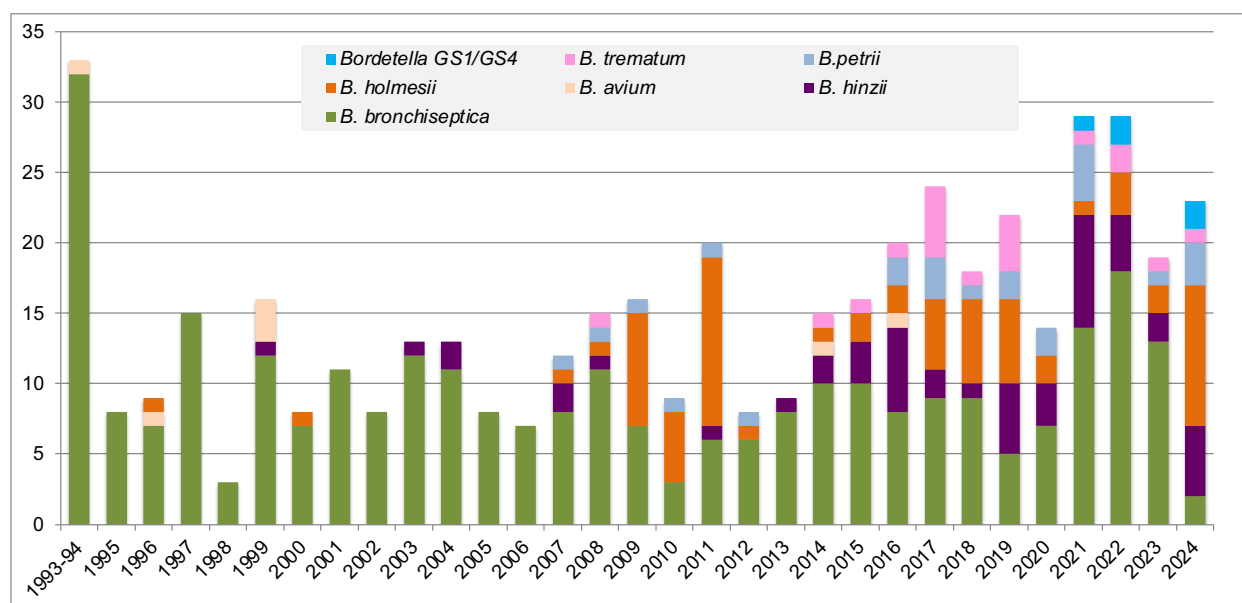


Figure. Nombre d'isolats de *Bordetella* reçus ou isolés au CNR depuis 1993, hors *B. pertussis* et *B. parapertussis*

Le CNR a reçu des isolats d'autres espèces de *Bordetella* (n=23, voir **figure ci-dessus**), principalement en provenance des hôpitaux du Col.BVH et isolés surtout de **patients adultes**. Ils se répartissent comme suit :

- **10 isolats de *B. holmesii*.** Décrite pour la première fois en 1995, *B. holmesii* est généralement associée à des bactériémies chez des patients immunodéprimés, en particulier les sujets aspléniques ou drépanocytaires, mais aussi à des infections respiratoires, pouvant provoquer chez l'humain des symptômes comparables à la coqueluche. Par ailleurs, *B. holmesii* est souvent confondue avec *B. pertussis*, car les tests diagnostiques de routine pour la coqueluche (IS481) ne sont pas toujours spécifiques à l'espèce. Pour les cas de 2024, il s'agissait essentiellement de patients adultes (âge moyen : 31 ans ; écart-type : 35). Parmi eux, on compte un patient drépanocytaire, deux patients immunodéprimés (dont un ayant bénéficié d'une greffe cardiaque et un autre splénectomisé), un patient atteint de mucoviscidose et deux présentant une bactériémie. Parmi les cinq cas pour lesquels l'information clinique était disponible, quatre ont été hospitalisés.
- **5 isolats de *B. hinzii*.** *B. hinzii* est principalement impliquée dans les infections respiratoires chez les volailles. Quelques cas d'infection pulmonaire ou digestive, ainsi que des bactériémies, ont néanmoins été décrits chez l'homme. En 2024, les isolats reçus provenaient de patients adultes dont l'âge moyen était de 65 ans (écart-type : 22), présentant d'autres comorbidités (leucémie aiguë, séquelles de tuberculose ancienne, BPCO) ou une co-infection (*Staphylococcus aureus*). Un patient présentait une bactériémie.
- **3 isolats de *B. pertrii*.** L'un provenait d'un patient de 80 ans hospitalisé pour grippe, présentant plusieurs comorbidités (BPCO, diabète). Les deux autres provenaient du même patient (40 ans), atteint de mucoviscidose, avec un intervalle de 7 mois entre les deux prélèvements. Les deux souches se sont révélées identiques d'un point de vue phylogénétique (voir figura page 24). Aucune information sur le traitement n'a été fournie.
- **2 isolats de *B. bronchiseptica*.** *B. bronchiseptica* est un agent pathogène du tractus respiratoire de

nombreux mammifères, dont l'homme. Chez ce dernier, la bactérie se comporte comme un pathogène opportuniste, atteignant généralement des sujets immunodéprimés ou présentant une atteinte respiratoire préalable. En 2024, il s'agissait de cas d'infections respiratoires chez des adultes âgés de plus de 62 ans avec une comorbidité sous-jacente (BPCO ou leucémie lymphoïde chronique). Selon l'analyse phylogénétique, **les deux isolats de 2024 appartiennent à la lignée de *B. bronchiseptica* I-1** (voir figure page 24).

- **1 isolat de *B. trematum*** chez un patient de 82 ans hospitalisé, présentant une bactériémie et une pneumonie. *B. trematum* a été décrite pour la première fois en 1996, après avoir initialement été isolée à partir d'infections auriculaires chroniques. Elle est toutefois très rarement associée à des bactériémies ou à des ulcères chroniques.
- **1 isolat de *Bordetella* génogroupe 1 ou *genome species* (GS1)**, isolé chez un patient de 15 ans à partir de la cicatrice de la cheville après ostéosynthèse. Au total, le CNRCOQ a identifié 4 cas d'infection à *Bordetella* GS1 en France depuis 2021 et reste très attentif à l'émergence de cette espèce.
- **1 isolat de *Bordetella* génogroupe 4 ou *genome species* (GS4)**, identifié pour la première fois au CNR, chez un patient de 51 ans décédé d'un choc septique et VIH positif.

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) (voir l'Annexe 2 pour plus d'informations sur la technique d'antibiogramme utilisée au CNR).

Macrolides : Les macrolides restent le traitement de première intention de la coqueluche, car ils réduisent le portage et la transmission bactérienne. Toutefois, en Chine, les souches de *B. pertussis* résistantes aux macrolides (MRBP) sont très répandues, dépassant 90 % dans certaines régions. Ailleurs, seuls des cas sporadiques de MRBP ont été rapportés, parmi lesquels le premier cas européen décrit en France en 2011 (Guillot et al., Emerg Infect Dis. 2012). Il demeure donc essentiel de suivre l'introduction et la diffusion de ces souches en France.

En 2024, le CNR a surveillé cette résistance selon deux approches :

1. Sur les souches isolées (n=367), en réalisant l'antibiogramme (voir Annexe 2), puis en confirmant la mutation responsable via l'analyse génomique (allèle 13 dans le schéma « macrolide resistance » de BIGSdb), validant ainsi le phénotype de résistance.
2. Sur l'ADN extrait de prélèvements respiratoires positifs en qPCR PTa (n=540), en recourant à notre qPCR ciblant l'ARNr 23S.

Ainsi, **14 souches MRBP ont été détectées et 4 prélèvements supplémentaires se sont révélés résistants sur la qPCR 23S** (dont un doublon confirmé par culture). Au total, le CNR a identifié **17 cas cliniques de MRBP en France en 2024**, correspondant à une prévalence globale de **1,9 %** (17 cas sur 907 échantillons testés). La

région la plus impactée est le Grand Est (8 cas), suivie de l'Île-de-France (3 cas), des Pays de la Loire (2 cas), de l'Auvergne-Rhône-Alpes (2 cas), de la Nouvelle-Aquitaine (1 cas) et de la Bretagne (1 cas), traduisant une dissémination de ces souches sur l'ensemble du territoire métropolitain.

Parmi ces 17 cas, on dénombre 4 nourrissons de moins de 12 mois, 6 enfants de 1 à 6 ans, 1 adolescent de 13 ans, ainsi que 6 adultes âgés de 18 à 79 ans. Parmi les cas documentés (n=11), 3 ont été hospitalisés, dont un nourrisson en réanimation. Sur les 14 souches caractérisées, **13 sont pertactine-négatives, de type ptxP3 et FIM-2**. Pour plus de détails concernant l'analyse génomique, veuillez-vous reporter à la **section 6** et à la prépublication (<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2025.03.15.25324024v1>).

Cotrimoxazole (Bactrim) : constitue l'antibiotique de deuxième intention dans le traitement de la coqueluche. En 2024, aucune souche de *B. pertussis* résistante n'a été détectée.

De plus, pour les souches MRBP, un panel élargi de molécules a été testé (ceftazidime, ceftriaxone, imipénème, piperacilline-tazobactam, tobramycine, amikacine, ciprofloxacine, doxycycline et tétracycline). Même si l'efficacité clinique n'a pas encore été démontrée, aucune souche n'a montré de résistance à ces antibiotiques.

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 2024, comme c'était le cas les autres années, tous les isolats de *Bordetella* présentaient une résistance naturelle à la céfalexine.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

1. Réseaux Nationaux

Réseau REMICOQ : Un réseau de Microbiologistes sur la Coqueluche, qui comprend les biologistes intéressés à la coqueluche, a été constitué *de facto* en 2023 par les réunions organisées par le CNR. Ce réseau regroupe des biologistes intéressés par la coqueluche, qu'ils fassent partie ou non du réseau RENACOQ, du Col.BVH ou de tout autre LBM, et souhaitant s'impliquer dans la surveillance de la coqueluche en France. Son activité inclut actuellement des réunions (en visioconférence) pour échanger sur l'épidémiologie et la microbiologie de la coqueluche en France, la diffusion des protocoles du CNR et le partage d'informations par e-mail. L'intention du CNR est de continuer à animer ce réseau dans les années à venir, en complément des réseaux décrits ci-dessous et des perspectives éventuelles de mise à déclaration obligatoire de la coqueluche chez les nourrissons, envisagée par SpF. **Le 26 mars 2024, une réunion a eu lieu pour aborder la recrudescence très marquée des cas observée en Europe, et en particulier en France, ainsi que l'importance de l'isolement de *Bordetella* et l'éventuelle évolution vers la déclaration obligatoire de la coqueluche.**

À la suite de cette réunion, Carla Rodrigues a été invitée à animer un webinaire REMIC's-SFM intitulé « **Coqueluche, le retour : alerte du CNR** » (voir section 6), et plusieurs microbiologistes ont ensuite contacté le CNR pour rejoindre le réseau REMICOQ.

Réseau RENACOQ : Notre CNR poursuit son implication forte dans le réseau hospitalier pédiatrique RENACOQ. Ce réseau a été créé en 1996. Il est coordonné par SpF et co-coordonné par le CNR pour la partie microbiologique. Il comprend 42 hôpitaux pédiatriques 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 poursuivrons 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.

Col. BVH : Le CNR entretient et renforce également ses liens avec le réseau de microbiologistes du Col.BVH. Ce réseau complète utilement celui de RENACOQ, notamment en fournissant de nombreuses souches issues d'infections autres que la coqueluche. Ainsi, une grande partie des isolats adressés au CNR concernent des espèces de *Bordetella* différentes de *B. pertussis* et *B. parapertussis*, contribuant à la surveillance des bordetelloses au-delà de la coqueluche. Toutefois, en 2024, sous l'effet de l'épidémie nationale de coqueluche, **27% des souches et prélèvements de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* reçus par le CNR proviennent du Col. BVH.**

Par ailleurs, dans le cadre de la Journée du Collège de Bactério-Viro-Hygiène des Hôpitaux (Col.BVH) 2025, dont le thème est « Petits patients, grands défis : les infections de l'enfant décryptées », Julie Toubiana a été invitée à présenter le 20 juin 2025 une communication intitulée « **Recrudescence des cas de coqueluche : la chorale du chant du coq** ».

Réseau Sentinelles : Nous maintenons notre collaboration avec les réseaux de médecine de ville, notamment le réseau Sentinelles (réunissant pédiatres et médecins généralistes). L'objectif de ce réseau est d'évaluer l'incidence de la coqueluche, de suivre la répartition des cas par classe d'âge et de mesurer l'impact de la politique vaccinale à l'échelle nationale. Au début de l'année 2025, une publication a rapporté l'incidence et caractéristiques cliniques des cas de coqueluche signalés entre janvier et décembre 2024 dans le cadre de la surveillance en soins primaires en France (Monchause T et al., Vaccine 2025, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2025.126862>).

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 participe à l'étude **EUpert V** qui vise à évaluer la dynamique des isolats produisant et 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). Dans le cadre de ce projet, 32 souches françaises ont été envoyées au début de 2025.

Laboratoire Européen de Référence Diphtérie-Coqueluche (EURL-PH-DIPE) : Notre CNR a été invité en 2023 et sélectionné début 2024 pour rejoindre le consortium de quatre institutions formant le Laboratoire de Référence de l'Union européenne pour la santé publique dans le domaine de la diphtérie et de la coqueluche (**EURL-PH-DIPE**, mandat 2025-2031). À la suite de notre nomination officielle par l'Union Européenne, la demande de financement a été validée et le mandat a débuté le premier janvier 2025. Ce mandat de laboratoire européen de référence témoigne de notre visibilité à l'international et nous amènera, en concertation avec l'ECDC et nos collègues du consortium, à **animer un réseau de laboratoires nationaux de référence à l'échelle européenne, avec comme activités principales : CEQs, renforcement de capacités, conseils, séroprévalence, épidémiologie génomique**.

Enfin, les membres du CNR assurent le rôle de curateur de la base de données des génotypes MLST et cgMLST de *Bordetella* (toutes espèces du genre) et des génotypes antigéniques ou autres de *Bordetella pertussis* (<https://bigsd.b.pasteur.fr>), standard international qui permet la comparaison des souches et le recensement de la biodiversité des *Bordetella*. A ce titre, nous sommes en contact avec nos collègues à l'international et collaborons sur le génotypage des souches épidémiques.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Partage de données des LBM Cerba et Eurofins-Biomnis

Le CNR interagit avec les LBM Cerba et Eurofins-Biomnis qui réalisent presque de 80% des tests de diagnostic de la coqueluche en ville 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 en 2024, avec l'envoi au CNR de prélèvements positifs en PCR avec un Ct faible, pour un essai de mise en culture (n =360). Cependant, en raison de la charge de travail accrue et des effectifs réduits, et étant donné que les patients n'étaient pas hospitalisés, **301 échantillons reçus dans le cadre de notre collaboration avec Cerba et Eurofins-Biomnis restent en attente de mise en culture (prévue pour 2025) et pour le dépistage de la résistance aux macrolides**.

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

Cible PCR	Nombre de PCR réalisées	Nombre de PCR positives (%)
IS481	89 511	14 955 (16,7 %)
IS1001		154 (0,2 %)

Le nombre de PCR coqueluche (IS481/IS1001) réalisées par Cerba en 2024 était de **89 511** (tableau ci-dessus), **16** fois supérieur à celui de 2023 (n = 5 672). Sur ces 89 511 PCR, **16,9 % étaient positives**, majoritairement PCR IS481 positives (**figure ci-dessous**).

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

Cible PCR	Nombre de PCR réalisées	Nombre de PCR positives (%)
IS481	90 244	20 511 (22,7 %)
IS1001		148 (0,2 %)

Pour le LBM Eurofins-Biomnis, sur les **90 244** PCR coqueluche réalisées en 2024, 22,9 % se sont révélées positives (dont 22,7 % détectées sur PCR IS481), comme l'indique le tableau ci-dessus. Le nombre de PCR coqueluche réalisées a **été multiplié par 11** par rapport à 2023 (n = 7 929).

Les données recueillies par ces deux laboratoires montrent une hausse notable de la circulation de *B. pertussis* à partir du mois de mars, culminant en août, puis se maintenant à un niveau plus faible depuis septembre.

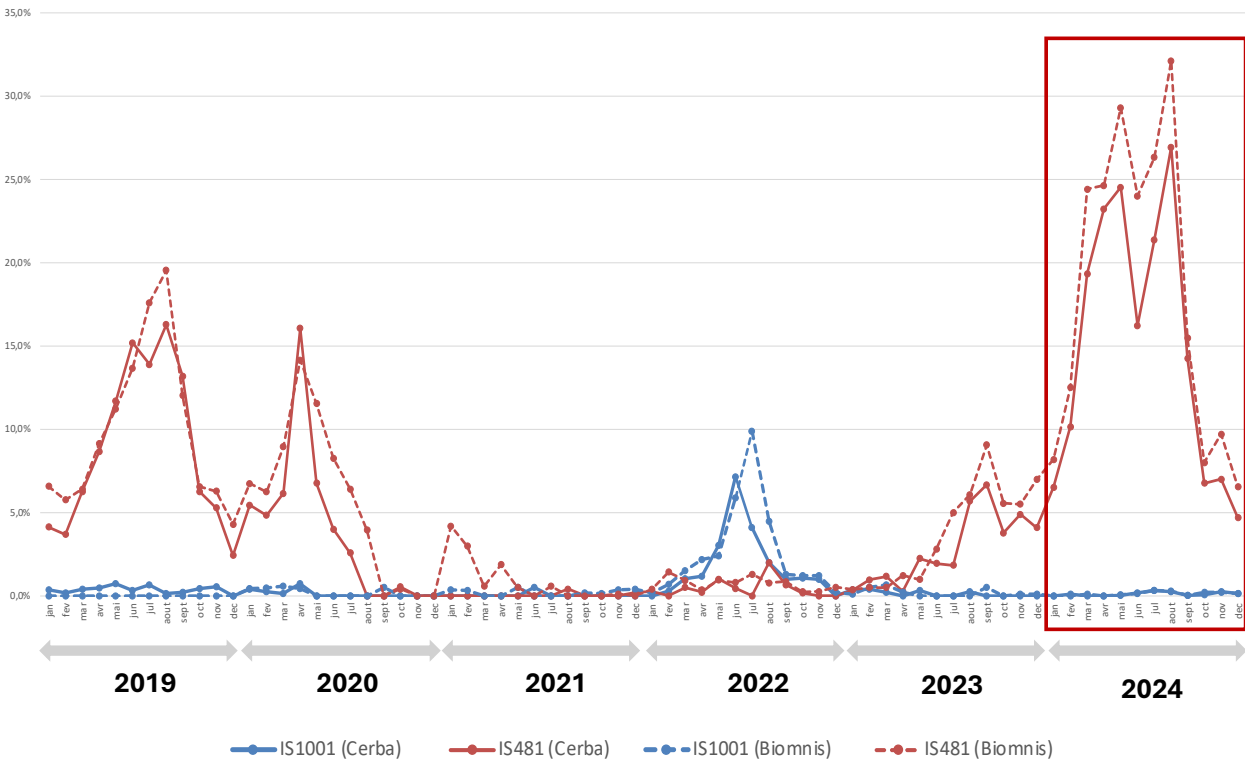


Figure. Pourcentage de PCR coqueluche positives réalisées par les LBM Cerba et Eurofins entre 2019 et 2024

La figure ci-dessous illustre clairement ce phénomène, avec un pourcentage de PCR IS481 positives qui a nettement augmenté durant mars et août, mettant également en évidence le caractère saisonnier de la coqueluche (printemps-été). On observe toutefois une légère baisse en juin, **liée à l'importante augmentation du nombre de tests réalisés après l'alerte émise par les autorités de santé**. Ces constats rejoignent les observations faites au sein du CNR.

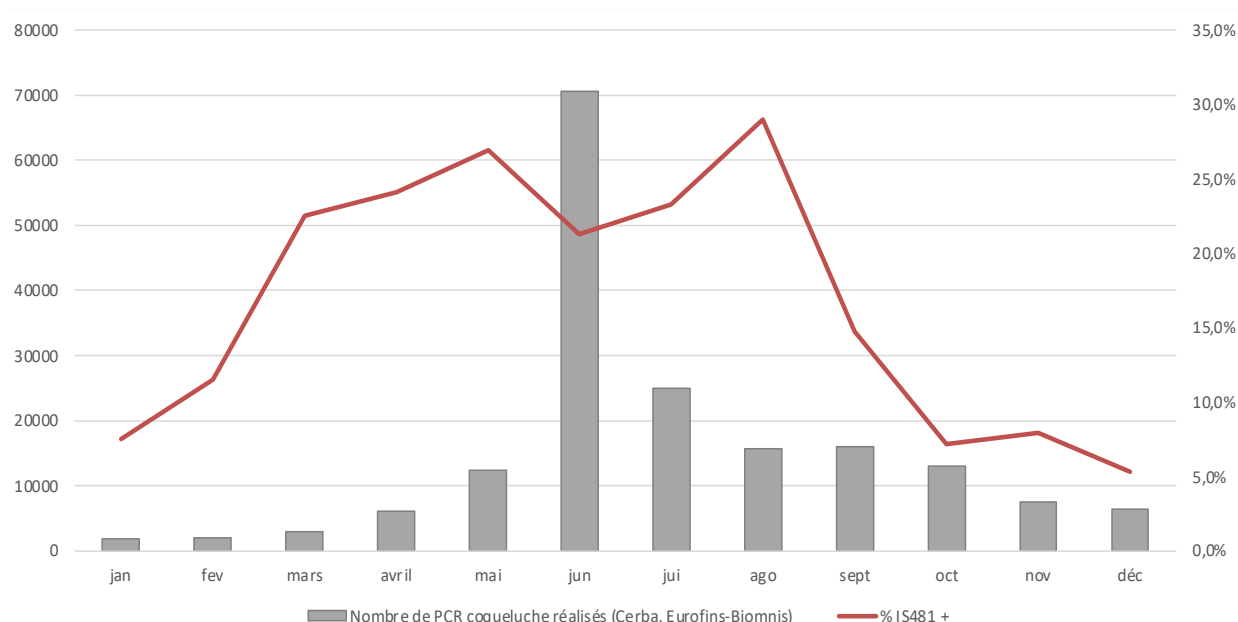


Figure. Nombre de PCR de la coqueluche réalisées et pourcentage de PCR IS481 positives réalisées par les LBM Cerba et Eurofins en 2024.

Publications en lien avec cette collaboration :

Rodrigues C, Bouchez V, **Soares A**, **Trombert-Paolantoni S**, Aït El Belghiti F, Cohen JF, Armatys N, Landier A, **Blanchot T**, **Hervo M**, REMICOQ study group, Toubiana J, Brisse S. Resurgence of *Bordetella pertussis*, including one macrolide-resistant isolate, France, 2024. Euro Surveill. 2024 Aug;29(31):2400459. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.31.2400459. PMID: 39092529; PMCID: PMC11295439.

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.

Le CNR a analysé 43 échantillons à la demande de l'ARS, principalement au premier trimestre, concernant des cas **groupés intrafamiliaux ou en collectivité**. Sur ces 43 échantillons, deux cultures de *B. pertussis* ont été obtenues, **28 échantillons ont été confirmés comme *B. pertussis***, et 10 ont été identifiés comme appartenant au genre *Bordetella* (IS481 positif). Les demandes ARS en 2024 se sont essentiellement concentrées au premier trimestre, **avant que l'explosion du nombre de cas ne rende le suivi détaillé des chaînes de transmission irréalisable**.

Les responsables du CNR ont participé à une réunion avec SpF le 8 février 2024, puis à une autre avec SpF, la DGS-CORRUSS et l'ARS le 18 juin 2024, pour faire le point sur la recrudescence de la coqueluche et présenter les données de résistance aux macrolides. Le CNR a également contribué à la partie consacrée à la résistance aux macrolides, ainsi qu'à la relecture de quatre bulletins publiés par SpF sur l'évolution de la coqueluche en 2024 (28 juin, 29 juillet, 18 septembre et 22 novembre 2024), le dernier annonçant toutefois la fin du cycle 2024.

En **début juin 2024**, face à la forte hausse du nombre de cas de coqueluche, **le CNR a publié une communication** (voir ci-dessous) pour alerter nos correspondants. Ce communiqué soulignait l'augmentation explosive des cas, détaillait les circonstances dans lesquelles adresser les prélèvements respiratoires positifs pour *B. pertussis* au CNR (charge bactérienne élevée, cas graves chez le nourrisson ou échec thérapeutique). Les laboratoires disposant des moyens nécessaires étaient ainsi encouragés à réaliser eux-mêmes la culture de *B. pertussis*.

Communication du CNR, juin 2024

Le CNR de la coqueluche alerte sur une **forte augmentation du nombre de cas de coqueluche à *Bordetella pertussis*** en France depuis début 2024.

À titre d'exemple, plus de 1400 cas confirmés par qPCR ont été détectés en avril 2024 et plus de 3000 en mai 2024.

Dans le contexte de recrudescence actuelle, devront être adressés au CNR les souches de *B. pertussis* isolées ou les prélèvements si :

- La charge bactérienne est élevée (Ct pour cible IS481/IS1001 ≤ 20 ou Ct pour ptxP [toxine de *pertussis*] < 30 ou PCR syndromique Filmarray positif) ; ou si
- L'échantillon est issu d'un nourrisson atteint de coqueluche sévère (hospitalisé en réanimation) ; ou si
- L'échantillon est issu d'un cas dont l'état s'aggrave malgré l'antibiothérapie par macrolide et/ou pourrait suggérer un échec thérapeutique.

Le CNR procédera à la mise en culture des prélèvements permettant la recherche d'éventuelles résistances aux macrolides et les caractéristiques antigéniques des isolats.

Si les laboratoires sont en mesure de mettre en place la culture de *B. pertussis* et que celle-ci réussit, l'antibiogramme devrait être réalisé localement puis la souche envoyée au CNR pour vérification et caractérisation approfondie.

→ [ACCÉDER AU DOCUMENT COMPLET](#)

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 en contactant le responsable, les responsables adjoints ou le secrétariat. Un numéro de portable est disponible en cas d'urgence. Le CNR peut également être contacté par courriel et une adresse e-mail dédiée au conseil clinique et microbiologique a été créée (coqueluche-conseil@pasteur.fr), ce moyen étant celui le plus utilisé aujourd'hui. 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 auxquelles nous nous efforçons de répondre en temps réel.

Les informations concernant la coqueluche et les activités du CNR sont accessibles aux professionnels de santé et au grand public via notre site web (dernière mise à jour le 04/04/2025). Le dernier rapport annuel d'activité est disponible en ligne sur le site du CNR :

<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses/rapports-d-activite>

Par ailleurs, le CNR dispose d'une section FAQ créée en 2022. En plus, toutes les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) ou du Haut Conseil de la santé publique (HCSP) destinées aux professionnels de santé sont mises à jour et consultables à l'onglet suivant :

<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses/la-maladie-recommandations>

Face à l'épidémie, le nombre de sollicitations a été sans précédent (plus de 250 demandes de conseil). Elles provenaient principalement de laboratoires de biologie médicale (LBM) qui mettaient en place la PCR coqueluche et avaient besoin d'avis concernant les kits, ainsi que d'une aide au diagnostic. Des questions relatives à l'antibiothérapie et à la vaccination, notamment aux rappels, étaient également très fréquentes.

En mars 2024, nous avons organisé une réunion par visioconférence avec le réseau REMICOQ pour aborder la résurgence attendue de la coqueluche et la nécessité de s'y préparer. À la suite de cette réunion, Carla Rodrigues a été invitée à présenter un webinaire intitulé « **Coqueluche, le retour : alerte du CNR** » le 20 juin 2024, organisé par la SFM et le REMIC, principalement à l'attention des biologistes et des cliniciens. Le 1er juillet 2024, le Dr Samy Taha et Carla Rodrigues ont également animé un webinaire du Centre Régional en Antibiothérapie (CRAtb) Île-de-France intitulé « **Augmentation des cas de coqueluche : Quelle PEC en ville ?** », destiné avant tout aux médecins généralistes. En outre, le 30 mai 2024, Julie Toubiana a donné un webinaire sur le **calendrier vaccinal à l'intention des médecins généralistes**, organisé par les réseaux de pédiatrie ambulatoire et de médecine générale, auquel plus de 350 médecins généralistes ont participé.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- Les responsables du CNR ont été sollicités pour relire le DGS-URGENT n° 2024_08, émis par le CORUSS le 7 juin 2024, intitulé « [Intensification de la circulation de la coqueluche en France et en Europe](#) ».
- Julie Toubiana a participé, au sein d'INFOVAC-France, à la rédaction du « [Bulletin N°6 de Juin 2024 Communiqué – Coqueluche](#) », élaboré par les groupes de travail du GPIP, de la SPILF, du GEFRUP et de l'AFPA.
- Julie Toubiana a également contribué au Groupe de travail du HCSP sur l'« [Avis relatif à la prévention de la transmission de la coqueluche aux personnes à risque de forme grave](#) », publié le 30 juillet 2024 à la suite de la forte recrudescence de cas de coqueluche en France.
- Carla Rodrigues et Julie Toubiana ont été consultées par la SFM pour la relecture de la recommandation émise par la HAS concernant le « [Choix et la durée des antibiothérapies : coqueluche chez le nourrisson, l'enfant et l'adulte](#) », publiée le 19 décembre 2024.
- Les responsables du CNR ont été sollicités par la HAS pour donner leur avis sur l'« [Intérêt des techniques d'amplification des acides nucléiques \(TAAN\) multiplex dans la prise en charge médicale des infections respiratoires basses](#) » pour le diagnostic de la coqueluche, publié en décembre 2024.
- Les responsables du CNR ont également participé à une réunion avec SpF le 8 février 2024, puis à une autre avec SpF, la DGS-CORUSS et l'ARS le 18 juin 2024, afin de faire le point sur la recrudescence de coqueluche et présenter les données de résistance aux macrolides. Le CNR a par ailleurs contribué à la partie consacrée à la résistance aux macrolides et à la relecture de quatre bulletins émis par SpF sur l'évolution de la coqueluche en 2024 (28 juin, 29 juillet, 18 septembre et 22 novembre 2024), **ce dernier annonçant néanmoins la fin du cycle 2024 de la coqueluche.**

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.

Face à la très forte recrudescence de la coqueluche, le CNR a reçu de nombreuses sollicitations de la part de divers médias (presse écrite, télévision, radio, médias en ligne). **Les interventions et interviews accordées ont bénéficié d'une large couverture : 43 articles de presse, 11 reportages télévisés, 13 passages radio et 187 publications web.**

5.4 Activité de formation

Notre unité BEBP fait partie du consortium « **Genomic Epidemiology and Bioinformatics Training for Public Health (GenEpi-BioTrain)** » (<https://www.pasteur.fr/fr/enseignement/programmes-cours/formation-interdisciplinaire-epidemiologie-genomique-bioinformatique-sante-publique>), financé par l'ECDC. GenEpi-BioTrain est un programme de formation interdisciplinaire visant à renforcer la surveillance, la préparation et la capacité de réponse aux épidémies en s'appuyant sur des approches de bioinformatique en santé publique et d'épidémiologie génomique. Il s'adresse à des professionnels issus de domaines variés (microbiologie, bioinformatique, épidémiologie, génomique, etc.), sans qu'une expérience préalable en bioinformatique ne soit requise. **Dans le cadre du projet GenEpi-BioTrain, le CNR a été impliqué dans plusieurs activités de formation décrites ci-dessous.**

Tout d'abord, une première formation, **sous forme d'une visite d'une semaine**, s'est déroulée sur le site de l'Institut Pasteur du 30 septembre au 4 octobre 2024. Cette visite se concentrait sur l'apprentissage des bonnes pratiques de bio-informatique dans la santé publique pour l'étude des pathogènes dont les maladies sont prévenues par la vaccination. Cette formation était destinée à 5 bio-informaticiens européens travaillant dans des centres nationaux de santé publique. Dès le premier jour, Carla Rodrigues a présenté l'organisation et les travaux du CNR. Les jours suivants, Sylvain Brisse et Valérie Bouchez ont expliqué les méthodes de surveillance et de prévention de la coqueluche, ainsi que la résistance aux antibiotiques chez *B. pertussis* et les outils pour la prédire. Enfin, ils ont dirigé des exercices pratiques sur la surveillance épidémiologique de la coqueluche à l'aide de la base de données *Bordetella* publiques disponible sur la plateforme BIGSdb-Pasteur. Deuxièmement, une **formation courte portant sur la phylogénie** pour la santé publique s'est déroulée du 4 au 6 novembre 2024 sur le site de l'Institut Pasteur. Cette formation était destinée à 9 bio-informaticiens européens travaillant dans des centres nationaux de santé publique. Sylvain Brisse a pu présenter la surveillance épidémiologique de la coqueluche effectuée au sein du CNR ainsi que les méthodes et approches phylogénétiques utilisées dans ce sens. En parallèle, un **webinaire portant sur les agents de la coqueluche** s'est tenu le 4 et 5 novembre matin. Ce webinaire était publiquement disponible à tous les participants ayant un compte sur la plateforme académique de l'ECDC ; environ 200 participants étaient inscrits à chaque session. Lors de ce webinaire, Sylvain Brisse et Valérie Bouchez ont présenté une introduction détaillée sur les agents de la coqueluche, la surveillance épidémiologique du CNR et l'évolution génomique de *B. pertussis* et *B. parapertussis* sous pression vaccinale. Leur intervention a couvert les aspects théoriques indispensables à la compréhension de la maladie et de sa surveillance. Enfin, Valérie Bouchez a animé des exercices pratiques de génotypage rapide de *B. pertussis* à l'aide de la base de données *Bordetella* sur BIGSdb-Pasteur.

Enfin, un **cours de 2 semaines** destiné à 30 professionnels européens de la santé publique travaillant dans des centres nationaux s'est déroulé du 2 au 13 décembre sur le site de l'Institut Pasteur. Cette formation s'est focalisée sur l'apprentissage de l'épidémiologie génomique et de la bio-informatique appliquée aux pathogènes dont les maladies sont prévenues par la vaccination et représentent un danger pour la santé publique (dont la coqueluche). Lors de ce cours, plusieurs intervenants du CNR et de SpF ont présenté la surveillance de la coqueluche en France et l'analyse des données microbiologiques et génomiques faite par le CNR.

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 2024, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

A) Études finalisées et publiés en 2024

1. Réémergence de *Bordetella pertussis*, incluant un isolat résistant aux macrolides, France, 2024

À l'instar d'autres pays européens, la France connaît une résurgence de la coqueluche en 2024. Entre le 1er janvier et le 31 mai 2024, 5 616 (24,9 %) tests qPCR positifs pour *Bordetella pertussis* ont été détectés, après une période de trois ans au cours de laquelle l'incidence était quasiment nulle. Sur 67 isolats de *B. pertussis* cultivés et dont le génome complet a été séquencé, 66 produisaient la pertactine et 56 produisaient FIM2, ce qui contraste avec les années précédant la COVID-19. Un isolat du génotype Bp-AgST4 était résistant aux macrolides. La résurgence de la coqueluche pourrait favoriser les isolats qui produisent FIM2 et la pertactine.

Rodrigues C, Bouchez V, Soares A, Trombert-Paolantoni S, Aït El Belghiti F, Cohen JF, Armatys N, Landier A, Blanchot T, Hervo M, REMICOQ study group, Toubiana J, Brisse S. Resurgence of *Bordetella pertussis*, including one macrolide-resistant isolate, France, 2024. Euro Surveill. 2024 Aug;29(31):2400459. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.31.2400459. PMID: 39092529; PMCID: PMC11295439.

2. Association entre *Bordetella pertussis* produisant de la pertactine et coqueluche fulminante chez les nourrissons : une étude multicentrique en France, 2008-2019.

Objectifs : Les facteurs de virulence de l'agent responsable, *Bordetella pertussis*, pourraient être impliqués dans la coqueluche fulminante, la forme la plus sévère de la coqueluche chez le nourrisson. Nous avons cherché à évaluer l'association entre la coqueluche fulminante et le statut de production de la pertactine (PRN) par les isolats cliniques de *B. pertussis*.

Méthodes : Les nourrissons symptomatiques âgés de moins de 6 mois, avec une culture positive de *B. pertussis* entre 2008 et 2019, ont été inclus. Les isolats de *B. pertussis* et les données cliniques ont été recueillis auprès de laboratoires hospitaliers français via le réseau national de surveillance de la coqueluche. La coqueluche fulminante était définie comme un cas présentant une leucocytose $>40 \times 10^9/L$ et au moins un des critères suivants : insuffisance respiratoire, hypertension pulmonaire, choc ou défaillance multiviscérale. La production de PRN a été évaluée par western-blot. Les caractéristiques initiales des nourrissons et les résultats microbiologiques ont été comparés entre les patients avec et sans coqueluche fulminante. Pour identifier les caractéristiques cliniques et

microbiologiques associées à la coqueluche fulminante, un modèle de régression de Poisson modifié a été développé, les facteurs de confusion ayant été sélectionnés à l'aide d'un graphe acyclique dirigé.

Résultats : Nous avons inclus 361 nourrissons atteints de coqueluche (âge médian de 63 jours [intervalle interquartile : 39-86]), dont 32 (9 %) ont évolué vers une coqueluche fulminante. Aucune des mères n'avait été vaccinée pendant la grossesse. Parmi les 361 isolats de *B. pertussis* en cause, 294 (81 %) produisaient la PRN. Les patients atteints de coqueluche fulminante étaient plus souvent des nouveau-nés (risque relatif ajusté [RRA] : 3,62 ; intervalle de confiance [IC] à 95 % : 1,76-7,44), des nourrissons ayant des antécédents de prématurité (RRA : 7,08 ; IC à 95 % : 3,06-16,36), des nourrissons non vaccinés (RRA : 4,42 ; IC à 95 % : 1,02-19,24) et des nourrissons infectés par des isolats produisant la PRN (RRA : 3,76 ; IC à 95 % : 1,02-13,83).

Discussion : La production de PRN par *B. pertussis* était associée de manière indépendante à un risque accru de coqueluche fulminante. Dans un contexte où les vaccins anticoquelucheux acellulaires contenant la PRN favorisent l'émergence d'isolats déficients en PRN, notre étude suggère un rôle positif de ces vaccins dans l'évolution des populations de *B. pertussis* vers une virulence réduite.

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 Belghiti F, Guillot S, Rodrigues C, Brisse S, Cohen JF, Toubiana J. Association between pertactin-producing *Bordetella pertussis* and fulminant pertussis in infants: a multicentre study in France, 2008-2019. Clin Microbiol Infect. 2025 Feb;31(2):233-239. doi: 10.1016/j.cmi.2024.09.009. Epub 2024 Sep 19. PMID: 39306091

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

Entre mars et octobre 2022, un pic de détection de *Bordetella parapertussis* par qPCR (PCR en temps réel) a été observé en France.

Hypothèse : Il n'était pas clairement établi si ce pic était dû à la résurgence de souches déjà en circulation ou à une réintroduction dans le pays.

Objectif : L'objectif de cette étude est de comprendre l'augmentation transitoire de *B. parapertussis* observée en France en 2022, alors que sa détection avait pratiquement cessé d'être rapportée depuis le début de la pandémie de COVID-19 en 2020.

Méthodes : Nous avons analysé les données de PCR en temps réel (qPCR) provenant des deux plus grands laboratoires de ville français réalisant le diagnostic de la coqueluche, et caractérisé tous les isolats de *B. parapertussis* collectés sur la période 2016-2022 par le Centre National de Référence de la Coqueluche en France.

Résultats : Les analyses microbiologiques révèlent que 13 des 18 isolats bactériens collectés en 2022 produisent l'antigène vaccinal pertactine, alors qu'aucun des 22 isolats collectés sur 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 germes entiers sont encore utilisés.

Bouchez V, Toubiana J, Guillot S, Parapertussis Study Group, El Belghiti FA, Landier A, Armatys N, Trombert-Paolantoni S, Soares A, Rodrigues C, Brisse S. Transient reemergence of *Bordetella parapertussis* in France in 2022. J Med Microbiol. 2024 Jul;73(7). doi: 10.1099/jmm.0.001843. PMID: 38995835.

B) Études finalisées en 2024 et publiées ou en prépublication en 2025

1. Émergence de *Bordetella pertussis* résistant aux macrolides en France, 2024 : introduite depuis la Chine

La coqueluche est une maladie respiratoire extrêmement contagieuse, évitable par la vaccination, et causée principalement par *Bordetella pertussis* (Bp). Les macrolides constituent le traitement de première intention pour la coqueluche, réduisant le portage bactérien et la transmission. Des isolats de Bp résistants aux macrolides (MRBP) ont été signalés en Chine depuis 2011. Nous rapportons ici 14 cas de MRBP en France, recueillis entre février et novembre 2024.

L'analyse phylogénétique, basée sur les polymorphismes nucléotidiques simples du génome complet, a montré que ces 14 isolats appartiennent à un groupe de 349 isolats MRBP de génotype *ptxP3*, formant trois branches distinctes incluses dans la diversité des isolats d'origine chinoise. Ces données suggèrent trois introductions indépendantes en France. Deux de ces branches ont été détectées dans plusieurs régions administratives françaises, évoquant une transmission vers l'avant et une dissémination spatiale. Le clade *ptxP3*-MRBP est apparu en Chine vers 2016 et est devenu prédominant après 2020. Sa propagation en France en 2024 est cohérente avec l'aptitude élevée prédite du génotype *ptxP3* dans les pays utilisant des vaccins acellulaires.

Bouchez V, Lefrancq N, Toubiana J, Rodrigues C, Brisse S. Emergence of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* in France, 2024: out of China. medRxiv 2025.03.15.25324024; doi:https://doi.org/10.1101/2025.03.15.25324024

2. Typage précis de trois pathogènes bactériens respiratoires majeurs par séquençage à longues lectures ONT R10.4.1.

Le séquençage massif à haut débit a considérablement amélioré la génomique, le diagnostic et l'épidémiologie des pathogènes bactériens. Malgré sa grande précision, le séquençage à lecture courte peine à reconstituer complètement les génomes et à assembler les éléments extra chromosomiques tels que les plasmides. Le séquençage à lecture longue avec la technologie Oxford Nanopore Technologies (ONT) offre une alternative comportant des avantages, notamment un séquençage en temps réel et une rentabilité accrue, ce qui est particulièrement utile dans les contextes de ressources limitées. Cependant, les taux d'erreur plus élevés des données ONT ont jusqu'à présent limité son utilisation dans le typage génomique de haute précision. La récente commercialisation de la chimie R10.4.1 d'ONT, dont la précision brute de lecture est nettement améliorée (Q20+), propose une solution potentielle à ce problème.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances de la dernière chimie d'ONT pour le typage génomique bactérien, en la comparant à la technologie Illumina qui fait office de référence, et en ciblant trois pathogènes respiratoires d'importance en santé publique (*Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis* et *Corynebacterium diphtheriae*) ainsi que des espèces apparentées. À l'aide du Rapid Barcoding Kit V14, nous avons généré et analysé des assemblages de génomes avec différents modèles de *basecalling*, à différents niveaux simulés de profondeur de couverture. Les assemblages ONT ont été comparés à la référence Illumina pour évaluer la complétude des génomes et la précision du typage multilocus du génome central (cgMLST) (nombre de discordances alléliques).

Nos résultats montrent que les génomes obtenus à partir de données brutes ONT, traitées avec le modèle Dorado SUP v0.9.0 pour le *basecalling*, assemblées avec Flye, et présentant une profondeur de couverture minimale de 35×, maximisent la précision pour toutes les espèces bactériennes testées. Les taux d'erreur sont restés globalement inférieurs à 0,5 % pour chacun des schémas cgMLST, indiquant que les données ONT R10.4.1 sont adaptées au typage génomique à haute résolution, utile pour les enquêtes épidémiologiques et la surveillance en santé publique.

Zidane N, Rodrigues C, Bouchez V, Rethoret-Pasty M, Passet V, Brisse S, Crestani C. Accurate genotyping of three major respiratory bacterial pathogens with ONT R10.4.1 long-read sequencing. bioRxiv 2024.10.03.616467; doi: <https://doi.org/10.1101/2024.10.03.616467> (under review in *Genome Research*)

3. Apprendre la dynamique de la valeur sélective des agents pathogènes à partir des phylogénies.

La dynamique de la diversité génétique des agents pathogènes, incluant l'émergence de lignées présentant une valeur sélective accrue, est un concept fondamental en écologie des maladies et a des implications majeures pour la santé publique. Cependant, l'identification de telles lignées et l'estimation de leur valeur sélective associée restent difficiles et sont rarement menées en dehors des systèmes comportant un échantillonnage dense. Nous présentons ici *phylowave*, une approche évolutive qui résume les changements de composition des populations au sein d'arbres phylogénétiques, permettant de détecter automatiquement des lignées fondées sur des caractéristiques de valeur sélective communes et sur leurs relations évolutives. Nous appliquons cette méthode à un large ensemble de virus et de bactéries (SARS-CoV-2, influenza A sous-type H3N2, *Bordetella pertussis* et *Mycobacterium tuberculosis*), représentatifs à la fois de menaces bien étudiées et de menaces peu étudiées pour la santé humaine. Nous montrons que *phylowave* retrouve les principales lignées circulantes connues pour chaque pathogène et peut également détecter des modifications spécifiques d'acides aminés liées à des changements d'aptitude. De plus, *phylowave* identifie des lignées jusque-là non détectées, présentant une valeur sélective accrue, notamment trois lignées co-circulantes de *B. pertussis*. L'inférence réalisée avec *phylowave* est robuste aux échantillonnages inégaux et limités. Cette approche largement applicable offre une possibilité de surveiller l'évolution des populations de pathogènes en temps réel afin de soutenir les actions de santé publique et explorer les moteurs fondamentaux de la valeur sélective des agents pathogènes.

Lefrancq N, Duret L, Bouchez V, Brisse S, Parkhill J, Salje H. Learning the fitness dynamics of pathogens from phylogenies. *Nature*. 2025 Jan;637(8046):683-690. doi: 10.1038/s41586-024-08309-9. Epub 2025 Jan 1. PMID: 39743587.

C) Études en cours de finalisation

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

Nous avons réalisé une analyse de l'évolution génomique de *Bordetella parapertussis*, aussi responsable de syndromes de coqueluche chez l'homme dans le cadre d'une 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). Cette analyse basée sur une collection de 250 isolats de *B. parapertussis* provenant de France, Espagne et USA a permis d'analyser la dynamique de l'évolution de ce pathogène sous pression vaccinale ciblant *B. pertussis* et de mettre en lumière des parallèles évolutifs. Ce travail a été soumis dans le journal MBio. Les *reviewers* ont demandé des résultats complémentaires qui ont nécessité d'établir un MTA entre l'Institut Pasteur et l'hôpital Vall d'Hebron afin de pouvoir échanger des isolats et procéder à ces analyses. Nous sommes en train d'intégrer ces nouvelles données au manuscrit (posté initialement sur BioRxiv (Bouchez et al., doi: <https://doi.org/10.1101/2024.06.18.599646>) et allons resoumettre prochainement dans un autre journal.

2. *Bordetella holmesii* dans les suspicions de coqueluche : un pathogène fréquent ?

Au cours de la période allant d'avril 2019 à mars 2020, en collaboration avec CERBA, nous avons analysé 11 808 prélèvements nasopharyngés de patients symptomatiques dans le cadre du diagnostic de la coqueluche, en utilisant une approche triplex ciblant IS481, IS1001 et h-IS1001 pour différencier *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* et *Bordetella holmesii*. Parmi les 1 073 échantillons positifs pour des bactéries du genre *Bordetella*, 14 se sont avérés être *B. holmesii*, représentant 1,3 % des patients dont les symptômes évoquaient une coqueluche imputable à une infection à *Bordetella*. Les cas associés à *B. holmesii* concernaient principalement des adolescents et des adultes âgés de 12 à 58 ans. Durant la période étudiée, *B. holmesii* s'est donc révélé être un pathogène très rare dans les suspicions de coqueluche, suggérant qu'il touche plutôt les populations plus âgées, comparées à celles typiquement affectées par *B. pertussis*. Nous tâcherons dans l'année qui vient, de préparer un manuscrit afin de valoriser cette étude.

6.2 Liste des publications et communications de l'année 2024, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

a) Publications internationales

1. Leroux P, Matczak S, Bouchez V, Volant S, Ouziel A, Launay E, Faye A, Rabier V, Sarlangue J, Jeziorski E, Maakaroun-Vermeesse Z, Madhi F, Pinquier D, Lorrot M, Pouletty M, Cantais A, Javouhey E, Aït Belghiti F, Guillot S, Rodrigues C, Brisse S, Cohen JF, Toubiana J. Association between pertactin-producing *Bordetella pertussis* and fulminant pertussis in infants: a multicentre study in France, 2008-2019. Clin Microbiol Infect. 2025 Feb;31(2):233-239. doi: 10.1016/j.cmi.2024.09.009. Epub 2024 Sep 19. PMID: 39306091.
2. Rodrigues C, Bouchez V, Soares A, Trombert-Paolantoni S, Aït El Belghiti F, Cohen JF, Armatys N, Landier A, Blanchot T, Hervo M; REMICOQ study group; Toubiana J, Brisse S. Resurgence of *Bordetella pertussis*, including one macrolide-resistant isolate, France, 2024. Euro Surveill. 2024 Aug;29(31):2400459. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.31.2400459. PMID: 39092529.
3. Bouchez V, Toubiana J, Guillot S, Parapertussis Study Group, El Belghiti FA, Landier A, Armatys N, Trombert-Paolantoni S, Soares A, Rodrigues C, Brisse S. Transient reemergence of *Bordetella parapertussis* in France in 2022. J Med Microbiol. 2024 Jul;73(7). doi: 10.1099/jmm.0.001843. PMID: 38995835.
4. 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; Renacoq 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 Apr 2;42(9):2370-2379. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.02.090. Epub 2024 Mar 11. PMID: 38472070.

b) Protocoles

1. Bouchez V, Brisse S, Rodrigues C. Real-time PCR amplification and genotyping of the 23s rRNA from *Bordetella pertussis* using the LightCycler 480. Protocols.io, Nov 2024. [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3q4y1v25/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3q4y1v25/v1)

c) Communications nationales

1. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors de le 19^e congrès annuel de la Société Française de Microbiologie (SFM) MICROBES « **Genomic investigation of the 2023-2024 *Bordetella pertussis* resurgence in France, with macrolide resistant isolates** », le 8 octobre 2024 à Lille.

2. Carla RODRIGUES : présentation orale lors des Journées Départementales de Santé Globale de l'Institut Pasteur « **Genomic investigation of the 2023-2024 *Bordetella pertussis* resurgence in France** », le 29 novembre 2024 à Chantilly.
3. Valérie BOUCHEZ : présentation poster lors des Journées Départementales de Santé Globale de l'Institut Pasteur « **Emergence of macrolide-resistant *B. pertussis* isolates in France in 2024: out of China** », le 27 novembre 2024 à Chantilly.
4. Carla RODRIGUES : présentation orale lors de la 44ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) « **Investigation génomique de la recrudescence de *Bordetella pertussis* en France en 2023-2024, avec des isolats résistants aux macrolides** », le 16 décembre 2024 à Paris.

d) Communications internationales

1. Julie TOUBIANA : présentation orale lors de l'*European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) 2024* « **Association between fulminant pertussis and pertactin-producing *Bordetella pertussis* in infants: a multicenter study in France, 2008-2019** », le 22 mai 2024 à Copenhague.
2. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors de le *14th International Bordetella Symposium* « ***Bordetella pertussis* vaccines drive the evolution of *Bordetella parapertussis*** », le 26 juin 2024 à Prague.
3. Julie TOUBIANA : présentation orale lors de le *14th International Bordetella Symposium* « **Unraveling the effects of acellular vaccination on pertussis epidemiology and disease severity in France** », le 28 juin 2024 à Prague.
4. Carla RODRIGUES : présentation poster lors de le *14th International Bordetella Symposium* « **Genomics of the 2023-2024 resurgence of *Bordetella pertussis* in France, with one macrolide resistant isolate** », online le 24 juin 2024.
5. Carla RODRIGUES : présentation orale lors de l'EUPertStrain 2024 « **Genomic investigation of the 2023-2024 *Bordetella pertussis* resurgence in France** », le 2 octobre 2024 à London.
6. Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors de l'EUPertStrain 2024 « **Emergence of *B. pertussis* macrolide-resistant isolates in France in 2024: out of China?** », le 2 octobre 2024 à London.

e) Conférences sur invitation

1. Sylvain BRISSE : présentation orale lors du *Robert Koch Colloquium 2024* « **Understanding the Reemergence of Vaccine-Preventable Bacterial Infections: Insights from Global Pathogen Genomics** », le 23 mai 2024 à Berlin (Robert Koch Institute).
2. Julie TOUBIANA : webinaire sur le **calendrier vaccinal pour les médecins généralistes "Actualités sur la coqueluche"** le 30 mai 2024 (organisé par les réseaux de pédiatrie ambulatoire et des médecins généralistes : plus de 350 médecins généralistes participants).

3. Carla RODRIGUES : webinaire REMIC'S-SFM « **Coqueluche, le retour : alerte du CNR** », le 20 juin 2024.
4. Samy TAHA et Carla RODRIGUES : webinaire CRATb Île-de-France « **Augmentation des cas de coqueluche : Quelle PEC en ville ?** », le 1 juillet 2024.
5. Carla RODRIGUES et Valérie BOUCHEZ : webinaire organisé par l'*International Bordetella Society online workshop on current trend in pertussis epidemiology* « **Pertussis resurgence in France 2023-2024** », le 12 novembre 2024.
6. Julie TOUBIANA : **Actualités sur la Coqueluche** à AP-HP Necker, présentation de 60 minutes chez Pr O Lortholary (réanimateurs, infectiologues, microbiologistes), le 25 novembre 2024.
7. Julie TOUBIANA : **Actualités sur la Coqueluche** à AP-HP Bichat, présentation de 60 minutes chez Pr Y Yazdanpanah (réanimateurs, infectiologues, microbiologistes), le 6 décembre 2024.
8. Sylvain BRISSE : présentation orale lors de la 44^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) « **Résurgence de la coqueluche en France : le point de vue des experts ! – données microbiologiques** », le 16 décembre 2024 à Paris (session modérée par Bruno COIGNARD et Julie TOUBIANA).

f) Communications dans le cadre du programme de formation GenEpi-BioTrain

1. Carla RODRIGUES : présentation orale lors du *Exchange visit programme for vaccine preventable infections* « **Presentation of the French NRC for whooping cough and other Bordetella infections** », le 30 septembre 2024 à Paris (Institut Pasteur).
2. Sylvain BRISSE : présentation orale lors du *Exchange visit programme for vaccine preventable infections* « **Population structure and sublineages in C. diphtheriae and B. pertussis** », le 1 octobre 2024 à Paris (Institut Pasteur).
3. Sylvain BRISSE et Valérie BOUCHEZ : présentation orale lors du *Exchange visit programme for vaccine preventable infections* « **Focus on specific BIGSdb databases (Corynebacterium, Bordetella, with available schemes and their purposes)** », 1 octobre 2024 à Paris (Institut Pasteur).
4. Sylvain BRISSE : webinaire « **Whooping Cough Epidemiology and Surveillance** », le 4 novembre 2024.
5. Valérie BOUCHEZ : webinaire « **Genomic Evolution of Whooping Cough Pathogens under Vaccine Pressure** », le 4 novembre 2024.
6. Valérie BOUCHEZ : webinaire avec session pratique « **Rapid genotyping of B. pertussis using BIGSdb** », le 5 novembre 2024.
7. Carla RODRIGUES : présentation orale lors du *Interdisciplinary training in genomic epidemiology and public health bioinformatics applied to vaccine preventable infections* « **Presentation of the French NRC for whooping cough and other Bordetella infections** », le 4 décembre 2024 à Paris (Institut Pasteur).
8. Sylvain BRISSE : présentation orale lors du *Interdisciplinary training in genomic epidemiology and public health bioinformatics applied to vaccine preventable infections* « **Bordetella pertussis: genomic Epidemiology and Phylogenetics** », le 6 novembre 2024 à Paris (Institut Pasteur).

9. Sylvain BRISSE : présentation orale lors du *Interdisciplinary training in genomic epidemiology and public health bioinformatics applied to vaccine preventable infections* « **Whooping Cough Epidemiology: current situation in Europe and France** », le 6 décembre 2024 à Paris (Institut Pasteur).
10. Valérie BOUCHEZ : présentation orale *Interdisciplinary training in genomic epidemiology and public health bioinformatics applied to vaccine preventable infections* « **Genomic epidemiology applied to pertussis cases** », le 6 décembre 2024 à Paris (Institut Pasteur).

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 2 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.

En 2024, nous avons été contactés par l'équipe du CNR de Belgique au sujet d'un gorille décédé de la coqueluche et de la COVID-19 (<https://www.7sur7.be/belgique/le-gorille-matadi-meurt-du-covid-19-et-de-la-coqueluche-au-zoo-danvers-a-20-ans-seulement~a5511aee/?referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>). Le prélèvement respiratoire nous a été transmis par Hélène Martini (CNR Bordetella de Belgique), et nous avons expérimenté l'approche « *Nanopore Adaptive Sampling* » (voir section 8). Ce gorille avait été testé positif à *B. pertussis* par qPCR ciblant IS481 et PT. La charge bactérienne étant faible et le volume de prélèvement limité, la couverture de séquençage a été réduite. Malgré ces contraintes, nous avons pu identifier l'allèle *ptxP3* du promoteur de la toxine, correspondant à celui retrouvé dans la majorité des souches de *B. pertussis* actuellement en circulation. Nous comptons poursuivre ces travaux en optimisant la méthode.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

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

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/évaluation 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).

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 RENACQ ;
- Contribution, le cas échéant, au volet biologique des projets de surveillance européenne de la coqueluche ;

- Contribution, le cas échéant, à la mise en place de nouvelles modalités de surveillance de la coqueluche en population générale, en particulier en médecine ambulatoire.

4. Alerte

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

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

1.3 Locaux et équipements

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

1.4 Collections de matériel biologique

Voir l'annexe 4.

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 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 préparés dans la Plateforme Milieux de l'Institut Pasteur. Nous confirmons l'identification des isolats avec les techniques suivantes :

- Caractères macroscopiques par observation visuelle des cultures ;
- 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* (SPG/BSA) et cryobilles 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. paraptussis* 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. paraptussis* (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.

En 2024, nous avons également mise en place la nouvelle **PCR en temps réel pour la détection de la mutation dans le gène codant pour l'ARNr 23S conférant la résistance aux macrolides** ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3q4y1v25/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3q4y1v25/v1)), basée sur la publication de Kamachi et al. (https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/10/20-1035_article) (voir section 2.1).

Détermination de la sensibilité aux anti-infectieux

La sensibilité aux anti-infectieux des isolats cliniques envoyés ou isolés au CNR est évaluée par la méthode de diffusion en gélose (Müller-Hinton additionnée de sang de cheval, incubation à 35-36 °C, lecture entre 24 h et 72 h selon l'espèce), et interprétée suivant les recommandations PK-PD du CA-SFM 2013, en l'absence de breakpoints spécifiques pour *Bordetella*.

Pour *B. pertussis* et *B. paraptussis*, un premier antibiogramme est établi avec les molécules suivantes : ampicilline, céfalexine, streptomycine, érythromycine, azithromycine, clarithromycine, triméthoprine/sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) et spiramycine. En cas de suspicion de résistance aux macrolides, des E-tests sont réalisés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'azithromycine, de clarithromycine et d'érythromycine, et un antibiogramme plus complet (similaire à celui utilisé pour les autres *Bordetella*, voir ci-dessous) est alors effectué. Pour ces autres *Bordetella*, souvent plus résistantes à différentes classes d'antibiotiques, un panel élargi est testé : ampicilline, céfalexine, ceftazidime, imipénème, piperacilline-tazobactam, triméthoprine-sulfaméthoxazole, érythromycine, clarithromycine, azithromycine, spiramycine, streptomycine, tobramycine, amikacine, ciprofloxacine, doxycycline, tétracycline, ceftriaxone et chloramphénicol.

Après la détection en février 2024 d'une souche de *B. pertussis* résistante aux macrolides (mutation A2047G dans le gène codant pour l'ARNr 23S), le CNR a décidé d'inclure dans ses comptes rendus dans la section « Commentaires », à titre indicatif, les informations concernant la présence ou l'absence de résistance aux macrolides lors de l'isolement de souches de *B. pertussis*. Cette démarche, non accréditée et mise en œuvre à des fins de surveillance épidémiologique (les délais étant pas compatibles avec la prise en charge clinique), se heurte cependant à l'absence de breakpoints cliniques EUCAST pour *Bordetella*. Depuis 2014, le CA-SFM fournit des valeurs PK/PD sous forme de CMI, plutôt que de diamètres d'inhibition issus de la diffusion en gélose. Étant donné que le CNR ne dispose pas d'un système automatisé de détermination des CMI et que la réalisation d'E-tests pour huit antibiotiques est onéreuse, la

méthode de diffusion en gélose demeure privilégiée, et les recommandations de 2013 du CA-SFM restent le principal référentiel.

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 la mutation qui induit la résistance aux macrolides**

Le CNR réalise désormais la vérification de la mutation dans le gène codant pour l'ARNr 23S qui induit la résistance aux macrolides chez *B. pertussis* et *B. parapertussis* directement à partir des données de séquençage Illumina, via la plateforme BIGSdb (schéma 23S_rRNA : allèle susceptible : 1 ; allèle résistant : 13).

- **Vérification de la production des protéines vaccinales déterminants de virulence**

- Avec des anticorps monoclonaux spécifiques, par agglutination et immunofluorescence, en cas de doutes, 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).

Le CNR envisage, en 2025, de remplacer ces deux méthodes (agglutination et immuno-empreinte) par la technique ELISA (voir section 2.1).

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 (par génotypage ou par qPCR) 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

4. Annexe 4 : Recensement des collections de matériels biologiques (non destiné à être rendu public)

Cette annexe figure dans un document PDF distinct