CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DE LA COQUELUCHE ET AUTRES BORDETELLOSES

BILAN DES ACTIVITÉS 2017-2021

Responsable : Sylvain BRISSE

Responsables adjointes : Sophie GUILLOT (jusqu'au 31 décembre 2022) puis Carla RODRIGUES (à partir du 01/01/2023) et Julie TOUBIANA

Unité de Recherche Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes

Institut Pasteur

INSTITUT PASTEUR

REMERCIEMENTS

Le CNR remercie le réseau de correspondants microbiologistes et cliniciens, et en particulier les membres du réseau RENACOQ, pour l'envoi des échantillons, souches, résultats de tests moléculaires et informations associées, contribuant ainsi à la surveillance de la coqueluche en France.

NOTE

Ce document est basé sur le rapport d'activité 2017-2021 du CNR, et la candidature du CNR pour le mandat 2023-2027. Les parties non-pertinentes ou confidentielles du rapport original ont été supprimées afin de pouvoir rendre ce rapport public.

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 (S. Guillot, V. Bouchez, C. Rodrigues, J. Toubiana & S. Brisse. 2022. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence de la Coqueluche et autres bordetelloses – Bilan des activités 2017-2021. 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.

SOMMAIRE

SOMMAIRE 3
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES 5
1. NOTE DE PRESENTATION ET ENGAGEMENTS 6
1.1 COURRIER OFFICIEL D'ACTE DE CANDIDATURE 6
1.2 PRESENTATION SYNTHETIQUE 84
1.3 DECLARATION PUBLIQUE D'INTERET 86
2. DESCRIPTIF DES CAPACITÉS DU LABORATOIRE 87
2.1 ORGANISATION PROPOSEE POUR REPONDRE AU CAHIER DES CHARGES 87
2.2 LES MOYENS DU LABORATOIRE AFFECTES AU CNR 87
2.2.1 En matière de ressources humaines 87
2.2.2 Curriculum du responsable scientifique 88
2.2.3 État des emplois rémunérés pour assurer le fonctionnement du CNR 89
2.2.4 Organigramme du CNR 89
2.2.5 En matière d'équipements et de logistique 89
2.3 BREF DESCRIPTIF DES THEMATIQUES DE RECHERCHE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR 91
2.4 CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR 91
2.4.1 Liste des techniques de référence pour l'identification du genre et de l'espèce, l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux et le typage des isolats 91
2.4.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles 94
3. ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES 96
3.1 LES ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE 97
3.1.1 Nature des échantillons biologiques étudiés 97
3.1.2 Nombre d'échantillons reçus sur la période 2017-2021 98
3.1.3 Nombre d'isolats cliniques reçus entre 2017 et 2021 98
3.1.4 Nombre de PCR réalisées entre 2017 et 2021 99
3.1.5 Nombre de PCR et de sérologies depuis 2006 100
3.1.6 Informations complémentaires en provenance du laboratoire CERBA 100
3.1.7 Détermination de la sensibilité aux anti-infectieux 101
3.1.8 Techniques transférées vers d'autres laboratoires et contrôles qualité 102
3.1.9 Distribution des standards et divers produits biologiques 102
3.1.10 Recherche/développement sur les méthodes de diagnostic 102
3.1.11 Recherche/développement sur les méthodes de typage 104
3.2 CONSEIL AUX PROFESSIONNELS OU AUX AUTORITES DE SANTE 104
3.3 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE 105
3.3.1 Participation à des réseaux de surveillance 105
3.3.2 Surveillance de la coqueluche 105
3.3.3 Surveillance des isolats cliniques de *B. pertussis* 108
3.3.4 Surveillance des isolats cliniques de *B. parapertussis* 110
3.3.5 Surveillance des bordetelloses humaines autres que la coqueluche 111
3.4 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS 114
3.5 ALERTE 116
4. LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET ENSEIGNEMENTS 119
4.1 PUBLICATIONS NATIONALES 119
4.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES 119
4.3 COMMUNICATIONS NATIONALES 125
4.4 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES 126
4.5 ENSEIGNEMENTS DE 2011 A 2021 129
4.6 EXPERTISES 132

SOMMAIRE (SUITE)

5. DESCRIPTION DES PROCESSUS QUALITE ET GARANTIES MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU LABORATOIRE 133

5.1 DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE 133

5.2 RECONNAISSANCE DU LABORATOIRE PAR DES INSTANCES NATIONALES OU INTERNATIONALES 133

5.3 GESTION DE LA CONFIDENTIALITE 134

6. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE 135

6.1 CAPACITE A METTRE EN ŒUVRE LA TRANSMISSION REGULIERE ET AUTOMATISEE DE DONNEES VERS SANTE PUBLIQUE FRANCE 135

6.2 PROCEDURES VISANT AU RESPECT DE LA CONFORMITE A LA REGLEMENTATION RELATIVE AU TRAITEMENT AUTOMATISE DES DONNEES A CARACTERES PERSONNEL OU LES EVOLUTIONS PREVUES 135

7. PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2023-2027 136

7.1 ACTIVITES D'EXPERTISE 136

7.1.1 Réseaux de partenaires 136

7.1.2 Techniques de détection, d'identification et de caractérisation en développement ou dont le développement est prévu 137

7.1.3 Mode de constitution, de stockage et de mise à disposition des collections 137

7.1.4 Évaluation de techniques 137

7.1.5 Projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires 138

7.1.6 Travaux de recherche appliqués envisagés en lien avec les missions du CNR 138

7.2 ACTIVITE DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION 140

7.3 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE 141

7.3.1 Constitution, développement et animation de réseaux 141

7.3.2 Les modalités de surveillance de la résistance aux anti-infectieux 141

7.3.3 Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels 142

7.3.4 Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux 142

7.3.5 Les projets d'enquêtes ou d'études concourant à la surveillance 142

7.4 CONTRIBUTION A L'ALERTE 142

ANNEXES 143

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviation ou Acronyme	Dénomination
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANP	Aspiration naso-pharyngée
ARS	Agence Régionale de Santé
BGS	Bordet Gengou au sang
BSA/SPG	Bovine Serum Albumine/Saccharose Phosphate Glutamate
CBVH	Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux de France
CCTIRS	Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé
CDC	Center for Diseases Control
CFU	Colony Forming Unit (Unité Formant Colonie)
CgMLST	Core Genome Multi Locus Sequence Typing
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CQ	Contrôle Qualité
DGS	Direction Générale de la Santé
DIA	Data Independent Analysis
ECDC	European Center for Diseases Control
EQA / CEQ	External Quality Assessment / Contrôle Externe de la Qualité
HCSP	Haut Comité de la Santé Publique
LREMS	Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site de l'Institut Pasteur
MALDI-TOF	Spectromètre de masse à temps de vol (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight)
MCU-PH	Maître de Conférences Universitaire – Praticien hospitalier
MLST	Multilocus Sequence Typing
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PRM	Parallel Reaction Monitoring
qPCR	Réaction de polymérisation en chaine en temps réel (ou quantitative)
RENACOQ	REseau National de la COQueluche
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (mutation ponctuelle, polymorphisme nucléotidique simple)
SpF	Santé Publique France
SMQ	Système de Management de la Qualité

1. NOTE DE PRESENTATION ET ENGAGEMENTS

1.1 Courrier officiel d'acte de candidature

Centre National de Référence
de la Coqueluche et autres Bordetelloses

Sylvain Brisse
Responsable

Santé Publique France, Direction des maladies infectieuses

Paris, le 1er juin 2022

Monsieur le Directeur Général, Chers membres du comité des CNR,

J'ai l'honneur de faire acte de candidature pour le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses.

Pour assurer nos missions, je m'appuierai sur une équipe largement identique à celle du mandat précédent, ce qui assurera la continuité de l'expertise microbiologique, épidémiologique et clinique. Un changement notable sera le remplacement de notre responsable adjointe « historique », Sophie Guillot, par Carla Rodrigues, Pharmacienne biologiste, spécialisée en microbiologie médicale, et chercheuse (PhD) en génomique des populations appliquée à l'épidémiologie moléculaire et l'antibiorésistance. Carla Rodrigues est membre de l'unité hébergeant le CNR depuis près de 5 ans, et a donc été sensibilisée aux problématiques de la coqueluche. Une transmission de la part de Sophie Guillot est en cours depuis plusieurs mois, et continuera jusqu'à décembre 2022, pour assurer une transition optimale des expertises.

Le nouveau mandat continuera à bénéficier de la participation très active de Julie Toubiana, Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier (MCU-PH), pédiatre infectiologue, qui apporte une valence médicale précieuse pour garantir les aspects de conseil. Durant le mandat précédent, Julie Toubiana a été remarquablement active sur le conseil, y compris auprès des autorités (participation au groupe de travail du HCSP sur la vaccination contre la coqueluche chez la femme enceinte, par exemple), et bénéficie d'une reconnaissance remarquable dans ce domaine. De plus, ses projets de recherche sur la vaccinologie et l'épidémiologie de la coqueluche et de *Bordetella pertussis* ont été couronnés par de remarquables succès, par exemple sur l'impact du changement de calendrier vaccinal en 2013, ou de la COVID19 sur l'épidémiologie de la coqueluche (publications dans Lancet Inf. Diseases, EuroSurveilance et autres). Nous avons également progressé significativement sur la compéhension de l'impact des vaccins acellulaires sur l'évolution de souches de *B. pertussis*, ayant coordonné une grande étude génomique internatinale publiée récemment (Lefrancq, Bouchez *et al.*, Science Transl Med., 2022). Notre expertise scientifique conjointe, qui était fraîche il y a 5 ans, est maintenant largement consolidée et reconnue.

Comme pour les autres CNR de l'Institut Pasteur, nous nous appuierons sur les ressources support de l'Institut Pasteur (cf. document sur l'organisation générale à l'Institut Pasteur en Annexe). Le système de management de la qualité a été mis en place de longue date dans notre CNR et dans l'unité de recherche, et nos accréditations ISO 15189 seront maintenues. Par ailleurs, nos projets sur la vacinologie et l'immunité de la coqueluche, et sur les applications du séquençage génomique des souches à l'épidémiologie, seront poursuivis, avec l'ambition d'apporter des solutions permettant une meilleure surveillance en France et des possibilités étendues de collaboration internationale sur l'épidémiologie moléculaire et la physiopathologie de la coqueluche.

C'est donc dans un projet très intégré, combinant surveillance, clinique, épidémiologie, microbiologie, biologie des populations et immunologie, que s'inscrit notre candidature au CNR pour la période 2023-2027. Dans l'espoir que cette candidature sera retenue, Bien cordialement,

1.2 Présentation synthétique

La coqueluche, causée principalement par *Bordetella pertussis,* est une infection respiratoire hautement contagieuse et potentiellement très grave chez le nourrisson, qui continue de causer des décès du fait du manque de traitements totalement efficaces durant la phase aiguë. La vaccination contre la coqueluche a été introduite en 1959 en France et la couverture vaccinale est très élevée chez les jeunes enfants. Cependant, l'incidence de la coqueluche connait une augmentation depuis les dernières décennies dans les pays industrialisés et continue de représenter un défi important de santé publique, y compris en France. Cette résurgence est en partie imputée à la généralisation des vaccins acellulaires depuis les années 1990 dans ces pays. Les vaccins utilisés ont changé en France au début des années 2000, avec l'abandon d'un vaccin à « germes entiers » au profit d'un vaccin acellulaire mieux toléré, composé de quelques protéines immunogènes de la bactérie. Les conséquences de ce changement de vaccin sur la durée d'immunisation limitant l'infection sont évidentes, mais l'impact sur le portage et la transmission est encore mal compris et doit faire l'objet de recherches approfondies. Les changements de calendrier vaccinal peuvent également impacter la durée de protection induite, comme nous l'avons montré dans une étude récente en collaboration avec Santé Publique France (Paireau *et al*., Lancet Inf Dis, 2021). Par ailleurs, l'évolution des populations du pathogène, avec en particulier la perte de la pertactine qui est un des composants des vaccins, est clairement établie. Cependant, cette dynamique évolutive et ses conséquences sur la protection vaccinale, la transmission ou la sévérité des infections restent à surveiller. Enfin, il est à craindre, suite à la période COVID19 et les mesures barrières qui ont été suivesi d'une baisse radicale des cas de coqueluche, et une augmentation de la population sensible soit en augmentation et que cela se traduise par une résurgence prochaine et potentiellement exceptionnellement intense.

Les programmes de vaccination contre la coqueluche doivent donc être accompagnés d'une surveillance épidémiologique et d'une expertise microbiologique continues. Pour assurer nos missions de surveillance, nous nous appuierons sur les réseaux collaboratifs existants (RENACOQ, Sentinelles, laboratoires d'analyse médicale privés, EuPertStrain) en collaboration étroite avec les cliniciens, épidémiologistes et microbiologistes et Santé publique France. La culture des bordetelles, en particulier *B. pertussis*, peut être fastidieuse et tend à être abandonnée par les laboratoires, qui disposent de diagnostics moléculaires applicables directement sur les échantillons. Notre objectif est de renforcer le volet microbiologique de la surveillance en aidant les laboratoires à continuer la culture des bordetelles, au sein du réseau RENACOQ, et des autres laboratoires susceptibles d'isoler des bordetelles.

Le Centre National de Référence (CNR) de la coqueluche et autres bordetelloses, est intégré à l'Unité de recherche Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes (BEBP) de l'Institut Pasteur. L'unité héberge aussi le CNR de la diphtérie, et l'expertise de l'unité couvre la biodiversité et l'épidémiologie des pathogènes, ainsi que les liens entre la diversité

génomique et les phénotypes cliniques ou microbiologiques. L'unité a entrepris des projets de séquençage génomique ambitieux chez *B. pertussis* et *B. parapertussis*, pour comprendre l'effet des vaccins sur l'évolution des populations, et la dissémination spatiale des souches aux échelles locales et globales. L'unité développe aussi des activités de recherche sur la caractérisation fonctionnelle des isolats et l'analyse de la réponse immunitaire induite par l'infection ou les vaccins.

Les activités du CNR au cours des vingt dernières années ont permis de documenter l'évolution du pathogène et de l'épidémiologie de la maladie, d'améliorer les diagnostics biologiques et d'étudier les conséquences de la vaccination sur les micro-organismes ciblés. Nous nous proposons de poursuivre et prolonger ce rôle au service de la santé publique en France, en poursuivant notre modèle intégré entre activités de santé publique et activités de recherche fondamentale.

1.3 Déclaration publique d'intérêt

La déclaration publique d'intérêt de Sylvain Brisse a été mise à jour sur le site de Santé Publique France (https://dpi.santepubliquefrance.fr) le 16 mai 2022. Un résumé contenant toutes les rubriques où un item a été déclaré, est donné ci-dessous.

2.3. Participation(s) à des travaux scientifiques et études pour des organismes publics ou privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.3.1 Participation à des essais et études

EUROPEAN CDC, STOCKHOLM

Sujet : réseau EUpertLabnet: réseau Européen de surveillance de la coqueluche et de renforcement des capacités des laboratoires de référence

Type d'étude : Etude multicentrique

Votre rôle : Co-investigateur

Rémunération : aucune

Période : 01/05/2016 à aujourd'hui

2.3.2 Autres travaux scientifiques

INSTITUT PASTEUR

Sujet : Epidémiologie génomique des pathogènes - typage des souches, génomique - Recherche scientifique, publications - ceci dans le cadre de mon activité salariée à l'Institut Pasteur (pas de rémunération additionnelle)

Rémunération : À l'organisme (Institut Pasteur)

Montant perçu (Organisme) : Je ne sais pas

Période : 01/2011 à aujourd'hui

Par ailleurs, les modalités pour prévenir et gérer les conflits d'intérêts au sein des CNRs et de la CIBU de l'institut Pasteur sont présentées dans un guide pratique (voir section document supplémentaire, page 106)

2. DESCRIPTIF DES CAPACITÉS DU LABORATOIRE

2.1 ORGANISATION PROPOSEE POUR REPONDRE AU CAHIER DES CHARGES

L'unité de recherche Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes (BEBP) de l'Institut Pasteur assurera seule les exigences prévues au cahier des charges du CNR de la Coqueluche et autres bordetelloses, estimant que la présence d'un laboratoire associé n'est pas nécessaire.

Nous maintiendrons et poursuivrons notre interaction étroite avec Santé publique France (SpF), et continuerons à participer aux réseaux français, européens et internationaux de surveillance de la coqueluche.

2.2 LES MOYENS DU LABORATOIRE AFFECTES AU CNR

2.2.1 En matière de ressources humaines

Le Directeur du CNR, Sylvain BRISSE, est aussi le Directeur de l'unité BEBP.

Sophie GUILLOT, responsable adjointe et référente pour les questions microbiologiques jusqu'à fin 2022, sera remplacée par Carla RODRIGUES, docteur en pharmacie spécialisée en microbiologie, et post-doctorante dans l'unité BEBP depuis janvier 2018. C. Rodrigues sera recrutée par l'Institut Pasteur au 1er janvier 2023 à cette fin.

Valérie BOUCHEZ, ingénieure de recherche qui a une expérience de plus de quinze ans sur les bordetelles, continuera son implication dans l'équipe du CNR (en particulier sur la surveillance génomique et expertise microbiologique sur les bordetelles).

Julie TOUBIANA, infectiologue pédiatre, MCU-PH à l'hôpital Necker – Enfants malades et à la Faculté Paris-Descartes de l'Université Paris Cité, et rattachée à l'Unité de recherche BEBP pour ses activités de recherche, sera responsable adjointe du CNR, référente pour les questions médicales. Elle a participé au mandat précédent du CNR, et possède une expérience clinique de la coqueluche reconnue nationalement et internationalement. Elle est membre actif du Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP) et participe depuis plusieurs années au réseau RENACOQ.

Nathalie ARMATYS et Annie LANDIER, techniciennes supérieures au CNR, apporteront leur savoir-faire technique acquis lors du mandat précédent.

Isabelle MOULHERAT, assistante de l'Unité BEBP, consacrera 30% de son temps au CNR.

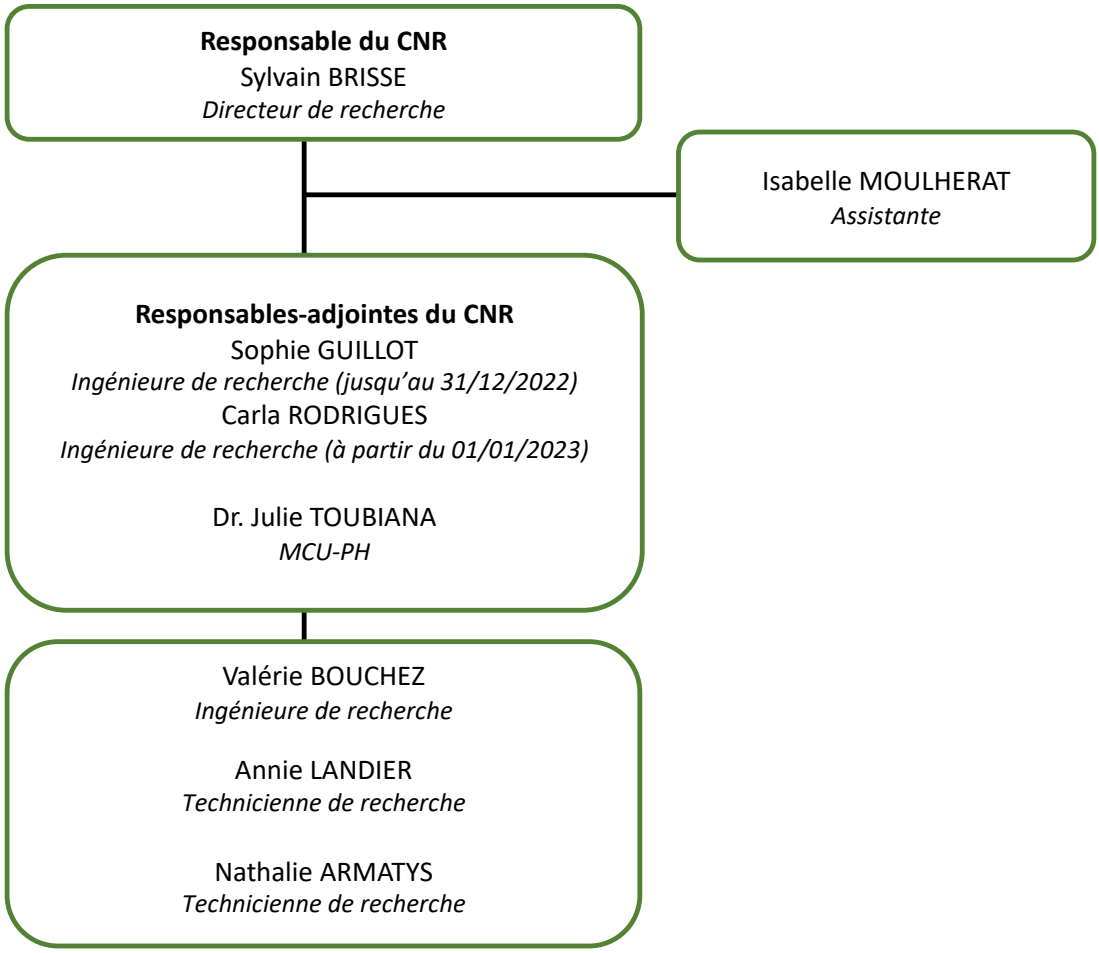
2.2.2 Curriculum du responsable scientifique

Cette partie a été supprimée du rapport public

2.2.3 État des emplois rémunérés pour assurer le fonctionnement du CNR

Cette partie a été supprimée du rapport public

2.2.4 Organigramme du CNR



2.2.5 En matière d'équipements et de logistique

Plans et surfaces des locaux de l'Unité de recherche Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes

L'unité BEBP est située dans le bâtiment 12 (dit Bio Top), au 2ème étage. L'unité occupe une surface d'environ 150 m^2. La distribution de pièces dans lesquelles l'activité du CNR est réalisée est détaillée dans le tableau **ci-dessous** :

Local dédié du CNR de la coqueluche	Surface
L2	10 m^2
Locaux communs au CNR et l'entité	
Bureaux (n=7)	40 m^2
L1 (Equipements type thermocycleur)	11 m^2
L1 (Biologie moléculaire et immunoempreinte)	33 m^2
Locaux communs partagés avec d'autres entités	
L2 (Pièce pour réception des produits biologiques)	12 m^2 (accès avec badge)
Salle de réunion	17 m^2
Pièce de pesées et stockage des produits chimiques	10 m^2
Ilot à déchets	8 m^2 (accès avec badge)
Pièce vestiaires	4 m^2
Chambre froide +5°C	9 m^2
« Marche en avant PCR » commune pour le traitement des prélèvements biologiques	28 m^2 (accès avec badge)
Pièces techniques	
1 Pièce technique (congélateurs -20°C et -80°C)	
2 Pièces techniques (accès avec badge) : Chaque pièce contient 1 congélateur -80°C dans lesquels sont stockés les souches de la collection du CNR	

Principaux équipements du CNR

- 3 postes de sécurité microbiologique (PSM)
- 2 étuves
- 1 microscope à fluorescence
- 4 congélateurs à -80°C et plusieurs à -20°C
- 2 incubateurs à agitation orbitale
- 1 spectrophotomètre à plaque
- 3 appareils PCR
- 1 thermocycleur en temps réel LC480 VII
- 5 centrifugeuses
- 2 balances de précision
- 2 spectrophotomètres pour acides nucléiques (1 Qubit / 1 Nanodrop)
- 1 spectrophotomètre pour les cultures bactériennes

De plus, nous bénéficions des équipements de la plateforme mutualisée P2M pour l'extraction (robot extracteur MagnaPure, Roche) et pour le séquençage Illumina des acides nucléiques (séquenceur NextSeq-500, Illumina).

2.3 BREF DESCRIPTIF DES THEMATIQUES DE RECHERCHE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR

Les thématiques de recherche de l'unité dans le domaine d'expertise du CNR couvrent la biodiversité des populations des bordetelles (taxonomie, structure phylogénétique, dynamique des génomes, liens génotypes-phénotypes) ; impact de la diversité des antigènes vaccinaux et de leur expression sur la virulence; protéomique pour la quantification de la production des facteurs de virulence et leur détection dans les prélèvements biologiques; l'épidémiologie des bordetelles (rôle des réservoirs et des sources d'infections, dynamique de la transmission locale à globale) ; ainsi que la réponse de l'hôte au vaccin et au cours des infections sévères (profilage de la réponse chez les cas sévères et en population normale, variabilité dans les populations humaines, impact sur la transmission).
Du point de vue applicatif, ces recherches contribuent à la mise au point de nouvelles méthodes d'identification ou de génotypage à partir des colonies isolées ou directement sur les prélèvements.

2.4 CAPACITES TECHNIQUES DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR

2.4.1 Liste des techniques de référence pour l'identification du genre et de l'espèce, l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux et le typage des isolats

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 CBVH. Nous utilisons le milieu Bordet-Gengou additionné de 15% de sang de cheval, avec ou sans céfalexine, ainsi que le milieu Reagan-Lowe (ou charbon) additionné de 10% de sang de cheval. Nous confirmons l'identification des isolats avec les techniques suivantes :

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

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

- ***PCR en temps réel (ou qPCR)***

La detection de l'ADN de la bactérie 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 IS*481* 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'IS*481* dans le génome de l'espèce *B. holmesii* et de certaines *B. bronchiseptica ;*

- La séquence d'insertion IS*1001* qui permet la détection de l'espèce *B. parapertussis* avec une bonne sensibilité du fait de la présence d'une vingtaine de copies du gène ciblé dans son génome. Cependant la séquence IS*1001* est présente dans le génome de certaines *B. bronchiseptica* ;

- La séquence d'insertion h-IS*1001* qui est spécifique de l'espèce *B. holmesii* ;

- La région promotrice de la toxine de pertussis (*ptx*A-Pr) qui est spécifique de l'espèce *B. pertussis* mais dont la détection est beaucoup moins sensible que celle de l'IS*481* ;

- Le gène BP3385 qui est spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle qui cible l'IS*481*. 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 ;

- La séquence en amont du gène de la flagelline *flaA* ; PCR FLA en duplex qui détecte spécifiquement l'espèce *B. parapertussis* (2 cibles positives) et qui permet de différencier cette espèce de l'espèce *B. bronchiseptica* (1 seule cible positive).

Les qPCR IS*481* et IS*1001* 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. Le CNR a la capacité d'organiser des contrôles qualité (CQ) pour le diagnostic de la coqueluche par PCR avec des laboratoires hospitaliers (réseau RENACOQ, principalement) ainsi que des laboratoires de biologie médicale de ville. Pour cela, des ADN codés sont préparés et distribués aux laboratoires participants qui doivent en déterminer la nature à l'aide de leurs techniques de diagnostic par PCR utilisées en routine. La liste des laboratoires ayant réalisés des contrôles qualités avec le CNR est indiquée sur le site web du CNR : *http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses*.

Détermination de la sensibilité aux anti-infectieux

Pour les isolats cliniques envoyés ou isolés au CNR, la sensibilité aux anti-infectieux (ampicilline, céfalexine, streptomycine, érythromycine, azithromycine, clarithromycine, trimétroprime/sulfaméthoxazole = cotrimoxazole) est testée par la méthode de diffusion en gélose à partir de disques (BIORAD). Les antibiotiques clarithromycine et azithromycine ainsi

que le cotrimoxazole (alternative en cas de contre-indication des 2 premiers antibiotiques) sont ceux recommandés en prophylaxie lors de contacts avec un cas ou lors de cas groupés de coqueluche.
Concernant les macrolides (érythromycine, azithromycine et clarithromycine), qui sont utilisés en thérapie, un seul isolat (2011) de *B. pertussis* a été trouvé résistant depuis la création du CNR en 1993 (Guillot *et al*. 2012, EID 18(6): 966-968). Tous les isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* présentent une résistance naturelle *in vitro* à la céfalexine.

Techniques de typage et de caractérisation des isolats cliniques

Le génotypage des isolats se fait par :

Typage 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) a longtemps été faite par PCR ciblée et séquençage Sanger. Elle se fait depuis 2016 par séquençage à haut débit (technologie Illumina) sous-traité sur la plateforme P2M de l'Institut Pasteur. Les séquences des gènes d'intérêt sont extraites au CNR 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/).

Génotypage par séquençage génomique

L'électrophorèse en champ pulsé a été utilisée comme la technique de référence pour le typage pendant plusieurs années mais elle a été arrêtée dès 2016 car peu discriminante pour les espèces *B. pertussis* et *parapertussis*. Elle a été remplacée lors du mandat précédent par l'analyse du core génome (cgMLST) défini au CNR (Bouchez *et al.* 2018, EID 24(6):988-994). Il est disponible dans la plateforme BIGSdb.

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

Le CNR réalise désormais la vérification de l'absence de la mutation qui induit la résistance aux macrolides directement à partir des données WGS, via la plateforme BIGSdb.

Vérification de la production des protéines vaccinales déterminants de virulence

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

Vérification de la production des autres déterminants de virulence

- par visualisation sur gélose au sang de l'hémolyse qui est une des activités de la toxine adényl cyclase-hémolysine.

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 d'une infection à *B. pertussis*, mais aussi d'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. 2014, DMID 78 : 302-6)). Le CNR n'effectue plus cette technique en routine depuis 2017.

2.4.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles

Description : nombre de souches, caractérisation

Notre collection de bactéries du genre *Bordetella* regroupe actuellement plus de 2500 isolats, dont environ 300 inclus sur la période 2017-2021. Nous saisissons systématiquement les données attachées aux isolats dans une base de données unifiée en utilisant l'application informatique Lagon. Les souches sont également séquencées et caractérisées phénotypiquement (voir section 3 ci-dessous).

Conditions de stockage

Tous les isolats de notre collection sont stockés à -80°C, chacun en double dans des congélateurs différents branchés sur une ligne électrique indépendante et sous surveillance électronique 24h/24h par un système d'alarme géré par le logiciel THERMOCLIENT. Un stock de chaque isolat est également conservé systématiquement dans l'azote liquide. Des isolats de référence ont aussi été déposés au Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRB-IP) et à la collection suédoise de Göteborg. La durée de conservation des isolats est testée régulièrement. Elle est au moins de 12 ans en milieu BSA/SPG à -80°C. En revanche, cette durée semble décroître avec le temps lorsque les isolats sont conservés sous forme lyophilisée (chute de plusieurs ordres de grandeurs en vingt ans) ; cette méthode n'est donc plus utilisée.

Conditions de mise à disposition de ces collections

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

Bases de données de séquences et données MLST

Depuis 2016, les isolats sont systématiquement séquencés par technologie Illumina, qui fournit à la fois le génotypage et les séquences de gènes importants pour le suivi de l'efficacité vaccinale. Les séquences génomiques sont mises à disposition de la communauté scientifique

suite à la publication de l'analyse des données correspondantes, ou en amont dans le cadre de collaborations scientifiques.

Les séquences génomiques de 1011 isolats français de la collection couvrant une période de 1953 à 2019 ont été obtenues depuis 2016 et utilisées pour analyser la dynamique spatio-temporelle des souches de *Bordetella pertussis* (Lefrancq, Bouchez *et al.* 2022, Sci Transl Med 14(642)). Ces séquences ont donc été rendues publiques (projet ENA – PRJEB21744, PRJEB42353, et PRJEB4568).

Le CNR a mis en place une librairie génomique des Bordetelles afin de regrouper les séquences génomiques de ce genre et de rendre accessible en ligne publiquement les séquences alléliques des gènes d'intérêt (typage, virulence, antigènes vaccinaux, résistance). Ce travail de compilation a permis la mise à jour de la nomenclature des espèces génomiques, lignées phylogénétiques et groupes clonaux dans le genre *Bordetella* (**Figure 1**) et a permis une harmonisation des analyses génomiques. Une publication issue de ces travaux est en révision (*preprint* disponible ici : https://doi.org/10.1101/2022.01.20.475763).

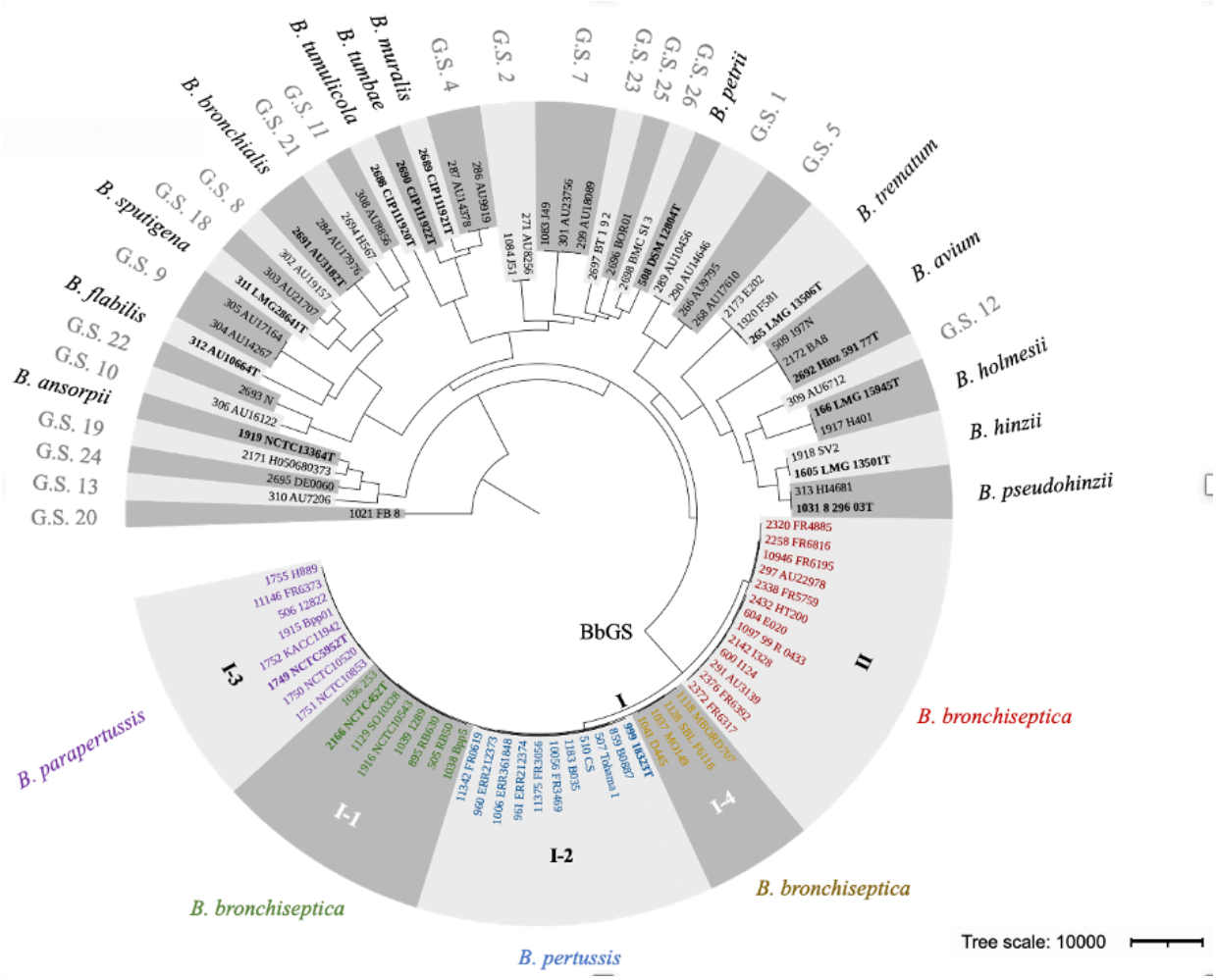


Figure 1 : Relations phylogénétiques dans le genre Bordetella

Source : Bridel, Bouchez *et al.*, 2022 BioRxiv (https://doi.org/10.1101/2022.01.20.475763)

3. ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES

Nos activités scientifiques et techniques comprennent l'expertise, le conseil, la surveillance et l'alerte. Ces activités correspondent à nos missions de santé publique, et sont intégrées à des activités de recherche en lien direct avec les activités du CNR. Nos recherches portent principalement sur l'épidémiologie, le diagnostic, l'évolution et la pathogénicité des bordetelles. Les deux encadrés suivants fournissent quelques informations sur les bordetelles et leurs antigènes vaccinaux.

Les bordetelles : diversité des espèces

Les bordetelles sont classées en 16 espèces (voir **Figure 1**), dont quatre infectent l'homme fréquemment : *B. pertussis* et *B. parapertussis*, les agents de la coqueluche ; *B. holmesii*, agent de bactériémies chez les sujets immunodéprimés en particulier aspléniques, et pouvant aussi être détecté lors d'un syndrome coqueluchoïde ; et *B. bronchiseptica*, qui cause la toux des chenils et peut induire chez l'Homme immunodéprimé des bactériémies ou des infections respiratoires. Au plan génomique, *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont des lignées clonales dérivées de *B. bronchiseptica*, leur espèce ancestrale qui a un mode de vie plus généraliste que ces deux pathogènes, spécialisés à l'homme.

B. petrii est une bactérie de l'environnement qui peut induire, bien que rarement, une infection respiratoire persistante chez l'homme. Finalement, *B. ansorpii* et *B. trematum* infectent l'homme de manière anecdotique. *B. avium* et *B. hinzii* infectent principalement les oiseaux sauvages et volailles.

De nouvelles espèces de *Bordetella*, très rarement rapportées, ont été récemment décrites : *B. bronchialis*, *B. sputigena*, *B. flabilis* ont été décrites chez l'homme ; *B. pseudohinzii* chez des souris de laboratoire ; et *B. muralis*, *B. tumulicola* et *B. tumbae* sur une tapisserie de plus de 1300 ans.

Les bordetelles : antigènes vaccinaux et facteurs de virulence

Les protéines bactériennes exprimées par les trois espèces classiques du genre *Bordetella* sont classées en (*i*) adhésines, qui permettent l'adhésion de la bactérie sur les cellules de l'hôte, et (*ii*) toxines, qui induisent des effets cytopathogènes (**Figure 2**).

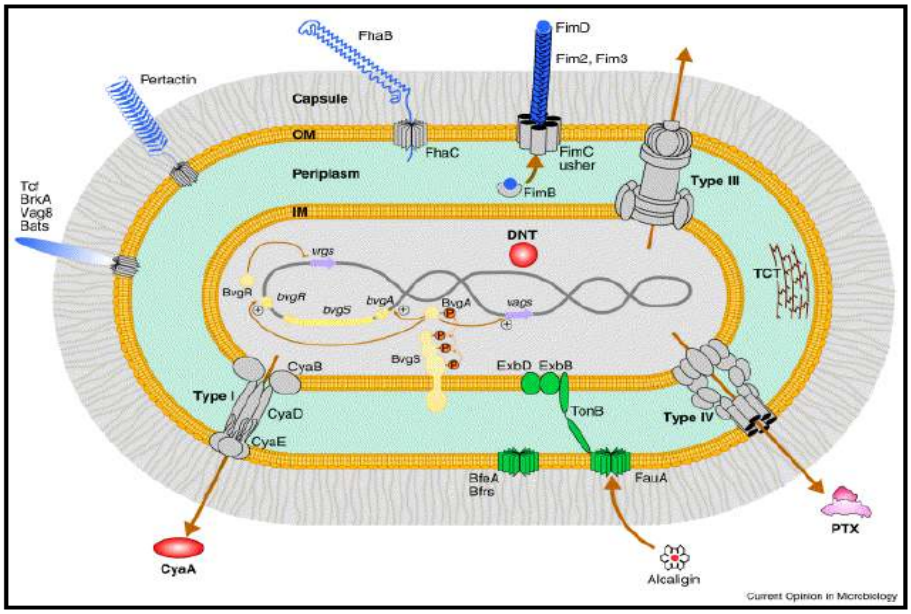
Les principales adhésines sont l'hémagglutinine filamenteuse FHA, les protéines fimbriales Fim2 et Fim3 et la pertactine PRN.

Les principales toxines sont :

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

Seule la toxine PT et les adhésines FHA, PRN, FIM2 et FIM3 entrent dans la composition de vaccins sous-unitaires utilisés actuellement en France (voir annexe 1). Une évolution des populations de *B. pertussis* vers un échappement à la pression de sélection exercée par l'immunité vaccinale a été mise en évidence par de nombreux travaux, dont ceux du CNR. Cette évolution se traduit par une divergence antigénique par rapport aux variants des antigènes utilisés dans les vaccins, ou par la perte d'expression de la PRN et, très rarement, d'autres antigènes. Il est donc important de surveiller ce phénomène, qui impacte potentiellement l'efficacité vaccinale.

Figure 2 : Schéma de la bactérie B. pertussis avec la mise en évidence de ses facteurs de virulence et composants vaccinaux



Les adhésines sont représentées en bleu, les toxines en rouge, les protéines de régulation en jaune.

Source : Locht et al. 2001, Curr Opin Microbiol 4(1):82-9

3.1 LES ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE

3.1.1 Nature des échantillons biologiques étudiés

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

- Patients infectés par *B. pertussis* (*ou B. parapertussis*) soit hospitalisés soit pris en charge en ville et dont les échantillons sont principalement envoyés par les microbiologistes participant au réseau RENACOQ ;
- Patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital ou dans des collectivités (crèches, établissements scolaires, collectivités, …) ;

- Patients infectés par *B. bronchiseptica* ou d'animaux infectés par cette bactérie ou par d'autres espèces de bordetelles et envoyés principalement par les bactériologistes du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux Généraux de France (source hors RENACOQ).

Par ailleurs, l'unité de recherche reçoit des prélèvements qu'elle caractérise dans le cadre de la surveillance organisée via le réseau ambulatoire français de pédiatres de ville ACTIV (qui ne sont pas comptabilisés dans les tableaux et figures de ce rapport).
L'ensemble des échantillons biologiques reçus au laboratoire est géré informatiquement à l'aide du logiciel Lagon.

3.1.2 Nombre d'échantillons reçus sur la période 2017-2021

Pour la période 2017-2021, nous avons analysé 668 échantillons. Ces échantillons incluaient :

- 311 souches de *Bordetella* spp., déjà isolées (isolats cliniques) pour lesquelles nous avons confirmé l'identification ou isolées au CNR à partir de prélèvements respiratoires positifs ;
- 7 souches bactériennes qui n'appartenaient pas au genre *Bordetella ;*
- 4 échantillons non cultivables mais identifiés comme Bordetelle par PCR ;
- 337 prélèvements (ou ADN déjà extrait) pour lesquels nous avons réalisé des PCR afin de vérifier la présence de l'ADN de *Bordetella* et/ou identifier l'espèce ;
- 9 échantillons inexploitables.

3.1.3 Nombre d'isolats cliniques reçus entre 2017 et 2021

Le nombre d'isolats cliniques reçus ou isolés au CNR entre 2017 et 2021 est présenté dans ce tableau :

Tableau 1 : Nombre d'isolats cliniques reçus sur la période 2017-2021

		Année					
Source	**Espèces**	**2017**	**2018**	**2019**	**2020**	**2021**	**Total**
RENACOQ							
	B. pertussis	59	53	41	9	0	162
	B. parapertussis	2	5	3	0	0	10
HORS RENACOQ/LABM							
	B. pertussis	7	12	7	2	0	28
	B. parapertussis	0	1	0	0	0	1
	B. bronchiseptica	9	9	5	7	15	45
	B. holmesii	5	6	6	2	1	20
	B. petrii	3	1	2	2	6	14
	B. hinzii	2	1	5	3	9	20
	B. trematum	5	1	4	0	1	11
Total		**92**	**89**	**73**	**25**	**32**	**311**

B. pertussis* et *B. parapertussis

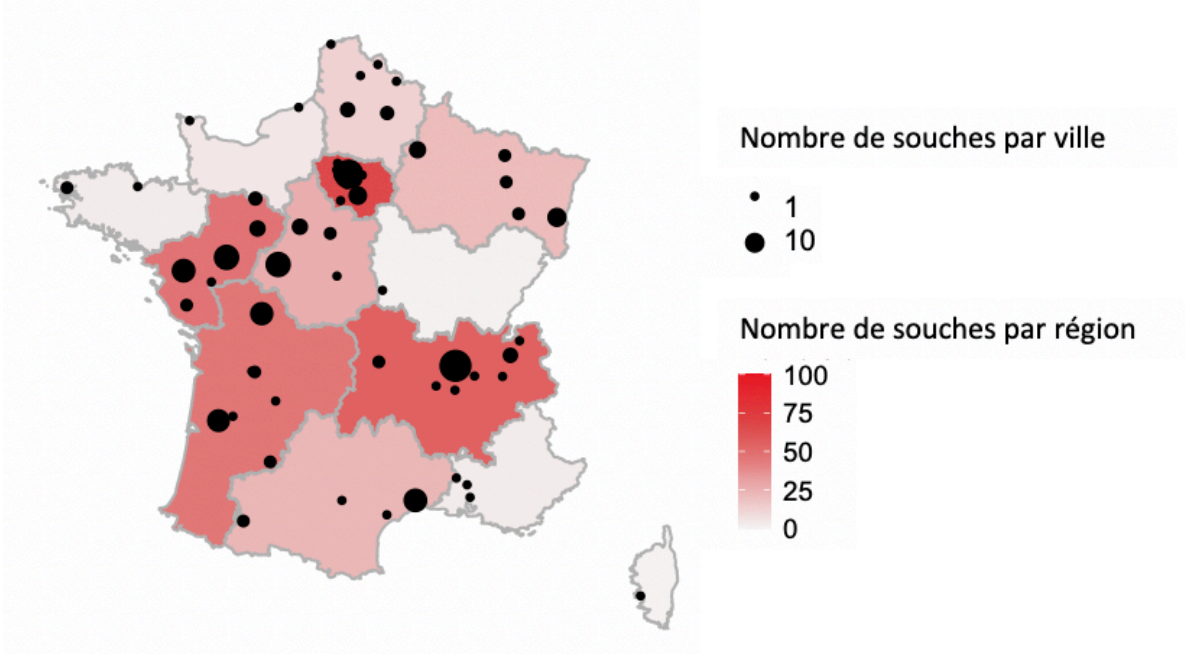
Nous avons reçu 190 isolats de *B. pertussis* dont 86% ont été envoyés par les bactériologistes du réseau RENACOQ ; et 11 isolats de *B. parapertussis*, tous en provenance de laboratoires du réseau RENACOQ sauf un.

Autres espèces de *Bordetella*

Comme les années précédentes, nous avons également reçu des isolats des autres espèces, en provenance principalement du collège de Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux de France. Parmi ces espèces, *B. bronchiseptica* est la plus commune.

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

Figure 3 : Répartition géographique des isolats de Bordetella envoyés au CNR en 2017 et 2021



3.1.4 Nombres de PCR réalisés entre 2017 et 2021

Le nombre de PCR faites par le CNR est présenté dans le tableau ci-dessous. Celles-ci ont été réalisées principalement dans le cadre de la surveillance RENACOQ, dans le cadre de la demande des ARS (notamment lors de cas groupés de coqueluche dans une école), et dans le cadre des contrôles de qualité (CQ) organisés par notre CNR et du contrôle externe de la qualité (CEQ) effectué chaque année.

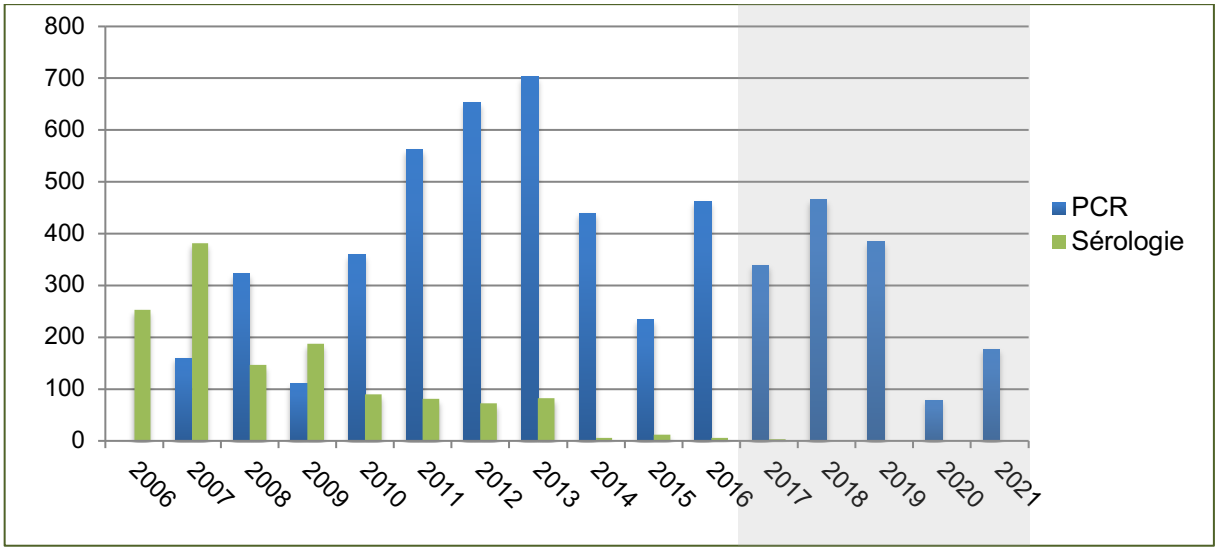
Tableau 2 : Nombre de PCR réalisées entre 2017 et 2021

Type de PCR	2017	2018	2019	2020	2021
Surveillance / mise au point nouvelle cible	263	319	155	43	92
Demande des ARS/CIRE lors de cas groupés	34	47	124	0	0
Évaluation de trousses commerciales	0	64	71	0	56
CEQ	43	36	36	37	42
Total	**340**	**466**	**386**	**80**	**190**

3.1.5 Nombre de PCR et de sérologies depuis 2006

La **Figure 4** montre le nombre de PCR et sérologies réalisées par année de 2006 à 2021. 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. Elles ne sont plus réalisées en routine depuis 2017.

Figure 4 : Nombre de PCR et de sérologies réalisées par le CNR depuis 2006



3.1.6 Informations complémentaires en provenance du laboratoire CERBA

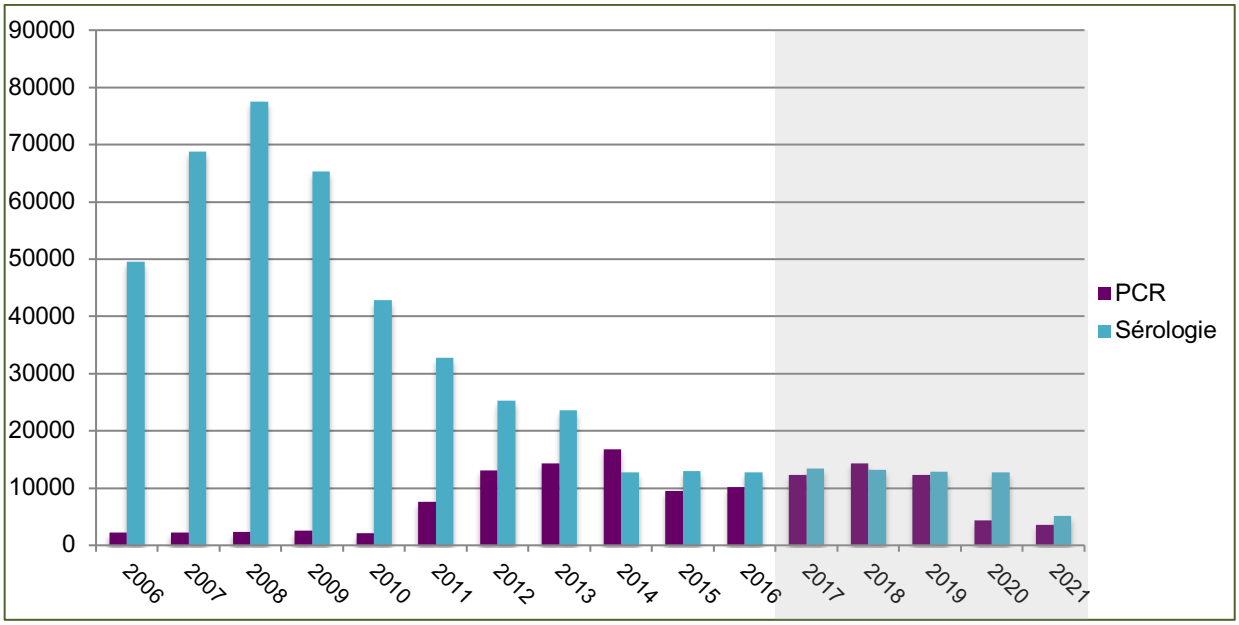
A notre demande, nous recevons chaque année le nombre de sérologies et de PCR réalisées (et le nombre de résultats positifs) du laboratoire CERBA (voir **Figure 5**). Ces données contribuent à suivre l'évolution de l'utilisation des diagnostics biologiques en France.

Le nombre de PCR réalisé par CERBA entre 2017 et 2019 a légèrement augmenté par comparaison avec les années 2015 et 2016. Le pourcentage de PCR positives a en revanche sensiblement augmenté en 2017 (14,3%) par rapport à 2016 (7%) puis s'est stabilisé en 2018 et 2019 (9%). Cette augmentation du pourcentage de PCR positives est le reflet du pic modéré observé pendant ces trois années. L'année 2020 a été marquée par la situation sanitaire

causée par la pandémie COVID19, avec une diminution importante du nombre de demandes de PCR et une diminution de la fréquence de PCR positives (4%). En 2021, le nombre de demandes de PCR n'a pas augmenté et le pourcentage de PCR positives était de 0,1% seulement. L'évolution du nombre de demandes de PCR dans le temps corrèle avec les cycles de cas de coqueluche observés depuis l'utilisation de la PCR pour le diagnostic de la coqueluche.

Les demandes de sérologies adressées au laboratoire CERBA sont stables depuis 2014, année de la publication des nouvelles recommandations du HCSP de ne pas réaliser les sérologies en pratique courante (hcspr20140710_conduitenircascoqueluche.pdf). En 2020 et 2021, le nombre de sérologies a nettement diminué, reflétant la forte la baisse des cas de coqueluche.

Figure 5 : Nombre de PCR et sérologies réalisées par le laboratoire CERBA, 2006- 2021



3.1.7 Détermination de la sensibilité aux anti-infectieux

Tous les isolats reçus ou isolés au CNR sont caractérisés pour leur niveau de sensibilité aux anti-infectieux (voir section 2).

Sur la période 2017–2021 :

Tous les isolats de *B. pertussis* présentaient une résistance *in vitro* à la céfalexine. Un isolat de *B. pertussis* résistant aux macrolides a été isolé, en 2011, pour la première fois en France. A notre connaissance, c'était le premier cas sur le continent européen. Il a fait l'objet d'une publication (Guillot *et al.* 2012 EID 18(6):966-968). Depuis, nous n'avons pas isolé de nouvelle souche résistante en France.

Cependant, la surveillance de la résistance aux anti-infectieux doit continuer. En effet, des publications récentes ont indiqué la prévalence très élevée des isolats de *B. pertussis* résistants aux macrolides en Chine (Xu *et al*. 2019, Emerg Microbes Infect; 8:461–70). D'autre

part, un premier cas de résistance aux macrolides a été décrit en Iran (Mirzaei *et al*. 2015, Jundishapur J Microbiol 8(7):e18190).

Les isolats de *B. parapertussis* étaient tous résistants *in vitro* à la céfalexine et à la streptomycine.

Tous les isolats de *B. bronchiseptica* présentaient une résistance *in vitro* à la céfalexine et à la streptomycine. Un isolat était aussi résistant à l'ampicilline et un autre au cotrimoxazole en 2021.

3.1.8 Techniques transférées vers d'autres laboratoires et contrôles qualité

Nous envoyons les modes opératoires décrivant les diagnostics de référence (culture ou PCR) aux laboratoires hospitaliers ou LBM qui en font la demande.
Nous avons poursuivi nos échanges avec les laboratoires hospitaliers ou privés pour le contrôle qualité de la technique de PCR en temps réel utilisée en France. Pour rappel, un contrôle qualité avait été organisé en 2016 pour 42 laboratoires. Différents ADNs avaient été préparés par le CNR pour constituer un panel. L'envoi du panel aux 42 participants avait été réalisé en juin 2016. L'analyse des résultats était en cours lors du précèdent rapport à 5 ans. La compilation des résultats a été envoyée à l'ensemble des participants en janvier 2017.

En 2017, nous avons collaboré avec les laboratoires du CHU de Mayotte et de l'Institut Pasteur de Bangui (République Centrafricaine) pour le transfert et la mise en place de nos qPCR diagnostiques (cibles IS*481* et IS*1001*) et d'identification spécifique de l'espèce de *B. pertussis* (cible *ptx*A-Pr).
En octobre 2018, le laboratoire mahorais nous a envoyé ses premiers échantillons positifs (extraits d'ADN, prélèvements et souches) pour vérification par le CNR. Nous avons confirmé les 2 cas d'infection à *B. pertussis* (fratrie mère et enfant) et un cas d'infection à *B. parapertussis* dans un autre foyer.

3.1.9 Distribution des standards et divers produits biologiques

Nous continuons d'envoyer des souches de référence des différentes espèces de bordetelles, ainsi que des ADN de référence purifiés, à des laboratoires hospitaliers français, européens, américains, ou à des laboratoires de biologie médicale.

3.1.10 Recherche/développement sur les méthodes de diagnostic

Évaluation de trousses commerciales pour le diagnostic de la coqueluche

En 2018, nous avons évalué la trousse « VIASURE Bordetella (fabriquant CerTest) » commercialisée par la société Orgentec. Le coffret permet la détection multiplexée en temps réel de l'ADN de *Bordetella* à l'aide des cibles IS*481* (détecte l'ADN de *B. pertussis*, de *B. holmesii* et de certaines *B. bronchiseptica*), IS*1001* (détecte l'ADN de *B. parapertussis*, et de certaines *B. bronchiseptica*) et h-IS*1001* (détecte l'ADN de *B. holmesii*). Le coffret contient également un contrôle cellulaire humain (abrégé : ICI). A la suite de la mise en place d'un

fichier de compensation de couleur, qui permet d'éliminer les fluorescences croisées, nous avons testé différents échantillons d'ADN extraits de prélèvements respiratoires humains ainsi que des contrôles internes de qualité. Des difficultés d'interprétation se sont présentées avec la cible h-IS*1001* pour des échantillons qui ne contiennent pas l'ADN de *B. holmesii* mais pour lesquels des valeurs de Ct ont été obtenues malgré une courbe d'aspect aplati. Cela pourrait être la conséquence d'une compensation non optimale lors de l'analyse avec le logiciel du thermocycleur de ROCHE. La société n'a pas amélioré le paramétrage et par conséquence les tests n'ont pas été poursuivis au niveau du CNR.
Ce problème de compensation de couleur ne concerne pas tous les thermocycleurs. Le laboratoire CERBA, désireux de pouvoir détecter spécifiquement l'ADN de *B. holmesii*, a testé la trousse Viasure avec un autre thermocycleur (CFX96 de Biorad). Disposant de peu d'échantillons positifs à *B. holmesii*, le laboratoire CERBA nous a demandé des échantillons afin de compléter leur validation. Ce travail a fait l'objet d'un poster, dans lequel le CNR été remercié, qui a été présenté à la RICAI en décembre 2019.

En 2019, nous avons évalué la performance de la technologie FilmArray RP2plus de Biofire (bioMérieux) pour le diagnostic de la coqueluche, en collaboration avec l'hôpital parisien St Joseph. Le FilmArray Respiratory Panel 2plus (RP2 +) est un test de diagnostic *in vitro* multiplexé avec une courte durée d'exécution pour la détection simultanée de 22 pathogènes respiratoires, dont *B. pertussis*. Le but de cette étude était de comparer la performance de ce test pour la détection de *B. pertussis* (test de référence PCR ciblant IS*481*) à un test de PCR en temps réel simplex (qPCR) ciblant la même séquence (*ptx*A-Pr). Pour cela, 18 échantillons (aspirations/écouvillons nasopharyngés et échantillons de contrôle externe de qualité) positifs avec la qPCR IS*481* (comparateur) et représentant une gamme de charge bactérienne décroissante, ont été analysés en utilisant les deux approches. 12 échantillons positifs pour *B. pertussis* avec la *ptxA*-Pr qPCR (valeur de Ct entre 18 et 35) ont été trouvés positifs avec RP2 +. 4 échantillons positifs avec la ptxA-Pr qPCR (valeur Ct entre 37 et 40) se sont avérés négatifs avec RP2 +. Enfin, 2 échantillons négatifs avec la *ptxA*-Pr qPCR, étaient également négatifs avec RP2 +. **Parmi les 18 échantillons positifs avec la qPCR IS*481*, les taux de détection de *ptxA*-Pr qPCR et RP2 + pour *B. pertussis* étaient donc de 89% et 67%, respectivement**. En conclusion, le test FilmArray RP2 + peut conduire à des résultats faussement négatifs et ne peut détecter que des échantillons fortement chargés (valeur *ptxA*-Pr qPCR Ct ≤ 35 ; valeur IS*481* qPCR Ct ≤ 28). Les résultats négatifs de RP2 + ne doivent pas être interprétés comme une absence de *B. pertussis* dans les échantillons cliniques, sans avoir au préalable vérifié le contexte clinique et épidémiologique du patient. Selon le cas, il peut être nécessaire contrôler le résultat par qPCR. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans OFID qui a été acceptée en 2020 (voir section 4) et ont été transmis à l'ensemble de nos laboratoires collaborateurs.

Accréditation de la technique de qPCR au CNR

Le CNR continue à utiliser les trousses ARGENE (*Bordetella* R-gene, qui utilise la cible IS*481* ; et *B. parapertussis* r-gene, qui utilise la cible IS*1001*) car elles ont l'avantage d'avoir un contrôle interne d'extraction/inhibition et surtout une haute reproductibilité. Ces deux techniques ont été accréditées selon le référentiel ISO 15189 (https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf).

Méthode d'identification des espèces avec la technologie MALDI-TOF (Bruker)

Nous avons mis en place la méthode d'identification des bordetelles par spectrométrie de masse.

Nous utilisons maintenant systématiquement cette technique d'identification pour les isolats envoyés ou isolés au CNR. L'avantage de cette technique est un coût moindre en termes de temps et de réactifs, en comparaison des méthodes d'identification antérieures (16S rRNA, galeries API). Des développements restent à faire pour l'identification des espèces rares ou nouvelles (voir partie 7.1).

3.1.11 Recherche/développement sur les méthodes de typage

Nous utilisons l'approche core génome MLST à l'aide du schéma cgMLST_*pertussis* (aussi disponible sur BIGSdb) qui a été validé sur des données du CNR (Bouchez et al. 2018, EID 24(6) : 988-994). Ainsi, plus de 1000 isolats de *B. pertussis* du CNR collectés en France représentant différentes périodes vaccinales et différents types antigéniques ont été séquencés. Ceci a permis d'établir la diffusion des souches de *B. pertussis* à différentes échelles géographiques et d'analyser à l'aide de modèles mathématiques l'influence de la vaccination acellulaire sur les génotypes en circulation (Lefrancq, Bouchez et al. 2022, Sci Transl Med 14(642).

3.2 CONSEIL AUX PROFESSIONNELS OU AUX AUTORITES DE SANTE

Le site web du CNR (http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses) donne nos informations de contact courrier électronique et téléphonique. Nous recevons très régulièrement ces deux types de contacts auxquels nous répondons en temps réel.

Entre 2017 et 2019, le nombre de conseils donnés et leurs modalités ont été relativement stables (**Tableau 3**). Ils sont moins fréquents que lors de la période précédente, ce que nous attribuons à une meilleure documentation disponible pour les professionnels en amont des appels (site web du CNR et Conduite à Tenir devant un ou plusieurs cas de coqueluche du HCSP, par exemple).

Création d'une Foire aux Questions. Sur le site web du CNR, nous maintenons à disposition des professionnels de la santé une foire aux questions (FAQ).

Tableau 3 : Sollicitations téléphoniques ou par courriel du CNR Coqueluche, 2017– 2021

	2017	2018	2019	2020	2021
Hôpitaux (tous services)	15	17	18	13	22
Pédiatres, Médecins généralistes, biologistes LBM	19	13	20	5	6
Collectivités	5	4	5	2	0
Particuliers	0	1	2	3	1
TOTAL	**39**	**35**	**45**	**23**	**29**

3.3 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

3.3.1 Participation à des réseaux de surveillance

En France, la surveillance de la coqueluche est réalisée grâce à plusieurs réseaux :

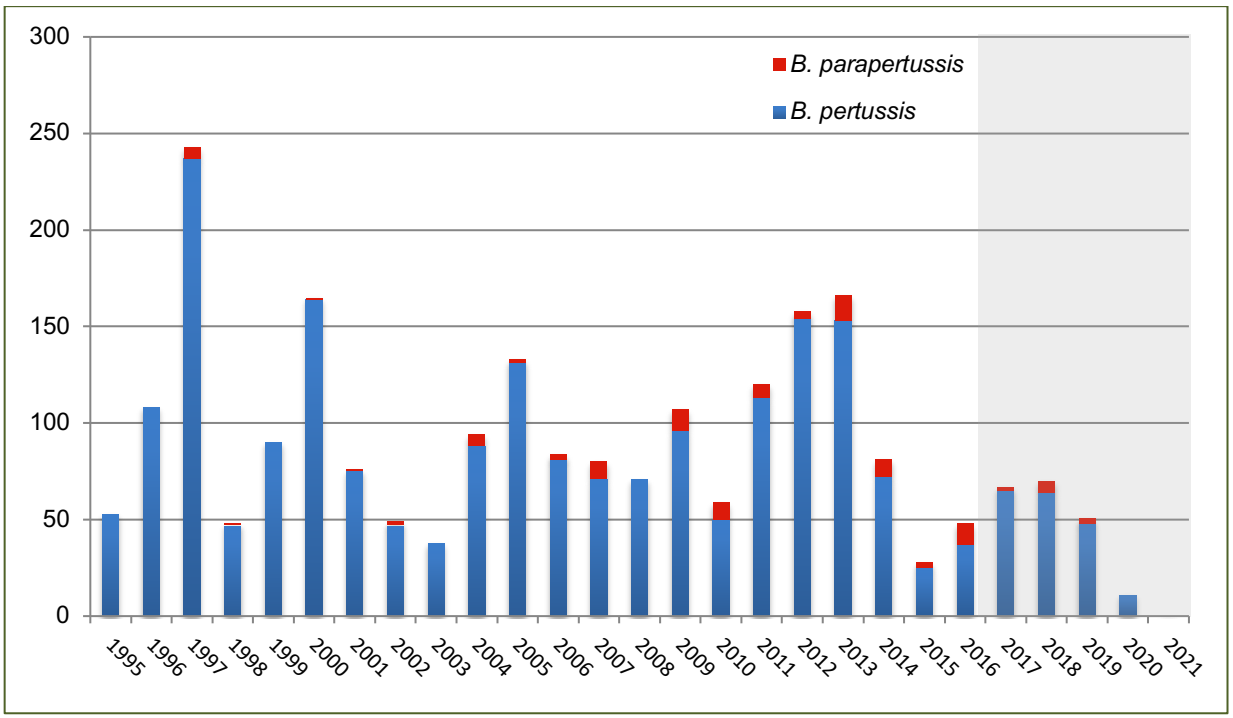
- Le réseau RENACOQ (REseau NAtional de la COQueluche), réseau de surveillance hospitalière pédiatrique initié en 1996 et coordonné par SpF. Il comprend 42 centres hospitaliers. Le CNR coordonne le volet microbiologique de ce réseau. Le réseau RENACOQ représente environ 30% des cas de coqueluche vus à l'hôpital en France.
- Le réseau du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des hôpitaux de France (CBVH).
- Le réseau Sentinelles, en partenariat avec SpF et le CNR.
- Au titre de l'unité de recherche BEBP, nous participons de plus au réseau ACTIV (Association Clinique et Thérapeutique Infantile du Val de Marne), réseau de 76 pédiatres de ville.

3.3.2 Surveillance de la coqueluche

Surveillance des isolats cliniques en provenance des réseaux RENACOQ et CBVH

L'épidémiologie de la coqueluche évolue selon des cycles qui durent de 3 à 5 ans (Bouchez *et al*., 2021 EuroSurveillance 26:2001213). Entre 2017 et 2021, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et à *B. parapertussis* sur la base du nombre d'isolats reçus ou isolés depuis 1995 (**Figure 6**).

Figure 6 : Répartition des isolats de Bordetella pertussis et parapertussis reçus ou isolés au CNR entre 1995 et 2021



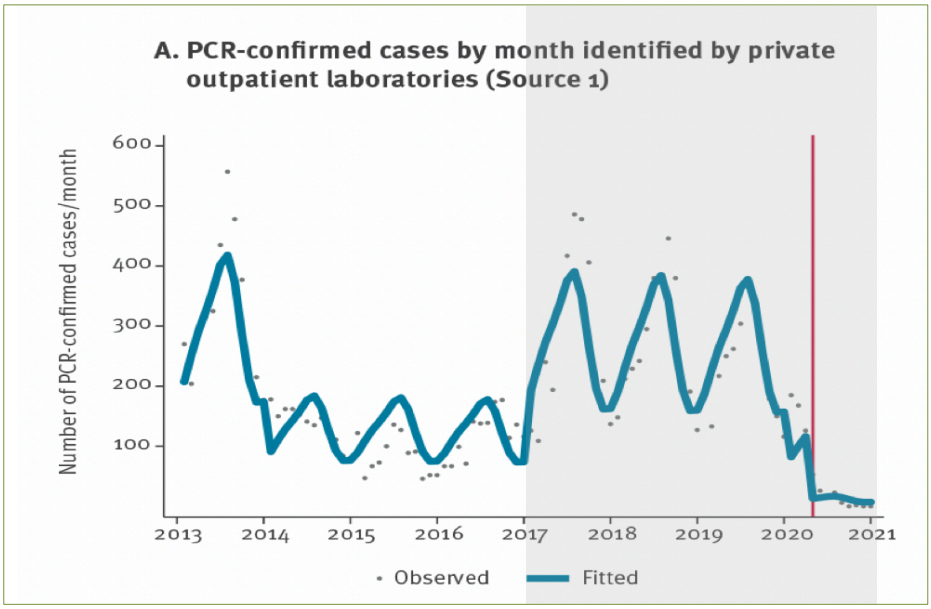
Le nombre d'isolats cliniques de *B. pertussis* a légèrement augmenté en 2017 par rapport à 2016, suggérant le début d'un nouveau cycle épidémique. Le nombre de cas s'est stabilisé en 2018, reflétant un pic épidémique modéré. En 2019, le nombre d'isolats reçus au CNR a légèrement diminué par rapport à 2018, indiquant une situation de vallée entre 2 cycles naturels. Nous avons observé une diminution brutale du nombre de cas en 2020 et 2021 dans un contexte sanitaire exceptionnel dû à l'épidémie mondiale de COVID-19.
Entre 2017 et 2020 (0 cas en 2021), 55 % des isolats de *B. pertussis* ont été collectés chez des nouveau-nés de moins de 6 mois. Nous n'avons pas observé de changement en comparant avec les années précédentes.
Concernant les isolats de *B. parapertussis* se référer au 3.3.4.

<u>Surveillance des cas de coqueluche en population générale (diagnostic fait en LBM)</u>

Nous collaborons activement avec les LBM CERBA et Eurofins-Biomnis qui réalisent plus de 90% des tests de diagnostic coqueluche en France. La biologiste de CERBA en charge du diagnostic de la coqueluche pour les laboratoires du groupe Cerballiance avait contacté le CNR début juillet 2017 pour l'informer d'une recrudescence des cas de coqueluche diagnostiqués par PCR. En conséquence de quoi, le CNR avait alerté SpF et une réunion avec l'équipe de SpF avait été organisée pour discuter des tendances observées au courant de l'année 2017. Depuis 2018, suite à une réunion avec les laboratoires CERBA et Eurofins-Biomnis, ces laboratoires envoient régulièrement au CNR les données de PCR coqueluche.

Nous avons donc pu analyser les données de PCR des 2 laboratoires pour les années 2016, 2017 et 2018. Ces données ont montré que le nombre de PCR IS*481* positives avait augmenté en 2017 avec un pic en juin-septembre 2017, suivi d'une nette diminution de septembre à mai 2018 sans revenir pour autant aux chiffres de 2016, puis un pic équivalent en juin-septembre 2018 (**Figure 7**). Ces données correspondent à une population différente des patients du réseau RENACOQ puisqu'il s'agit d'une population plus âgée avec une médiane d'âge aux alentours de 19 ans. Nous avons pu identifier que l'augmentation des PCR positives concernait principalement la classe d'âge 2- 5 ans. Cela nous a permis d'émettre l'hypothèse d'un impact du changement de schéma vaccinal en 2013 qui concerne cette classe d'âge. En collaboration avec l'équipe de Modélisation mathématique des maladies infectieuses (S Cauchemez), nous avons pu renforcer l'hypothèse d'une diminution de la durée de protection contre la coqueluche avec le schéma vaccinal récent (Paireau *et al*., Lancet Infect Dis. 2022).
En 2019, les données montrent également un pic en été mais avec une légère baisse du nombre de PCR positives par rapport à 2017-2018. En 2020, les trois premiers mois montrent une augmentation du nombre de PCR positives par rapport à décembre 2019 puis on observe une diminution drastique à partir d'avril 2020, pour atteindre une quasi absence de PCR positives à partir de septembre 2020. Ces observations corrèlent avec la forte diminution des isolats de *B. pertussis* et *B. parapertussis* reçus au CNR. Une analyse en série temporelle, intégrant les résultats des PCR de CERBA et Biomnis, et des réseaux RENACOQ et ACTIV, nous a permis du suggérer que les mesures barrières mises en place au début de l'épidémie COVID19, aient pu contribuer à la faible circulation du pathogène (Matczak, Toubiana *et al.,* accepté dans EuroSurveillance).

Figure 7. Nombre de PCR IS481 positives issues des données des laboratoires CERBA et Eurofins-Biomnis entre janvier 2013 et décembre 2021



Source : Matczak *et al*, *EuroSurveillance, in press*

3.3.3 Surveillance des isolats cliniques de *B. pertussis*

Surveillance des isolats de B. pertussis face à l'immunité vaccinale

La surveillance réalisée par le CNR permet de suivre les épidémies en temps réel. La caractérisation en routine des isolats permet en particulier de suivre l'évolution des antigènes vaccinaux au cours du temps.

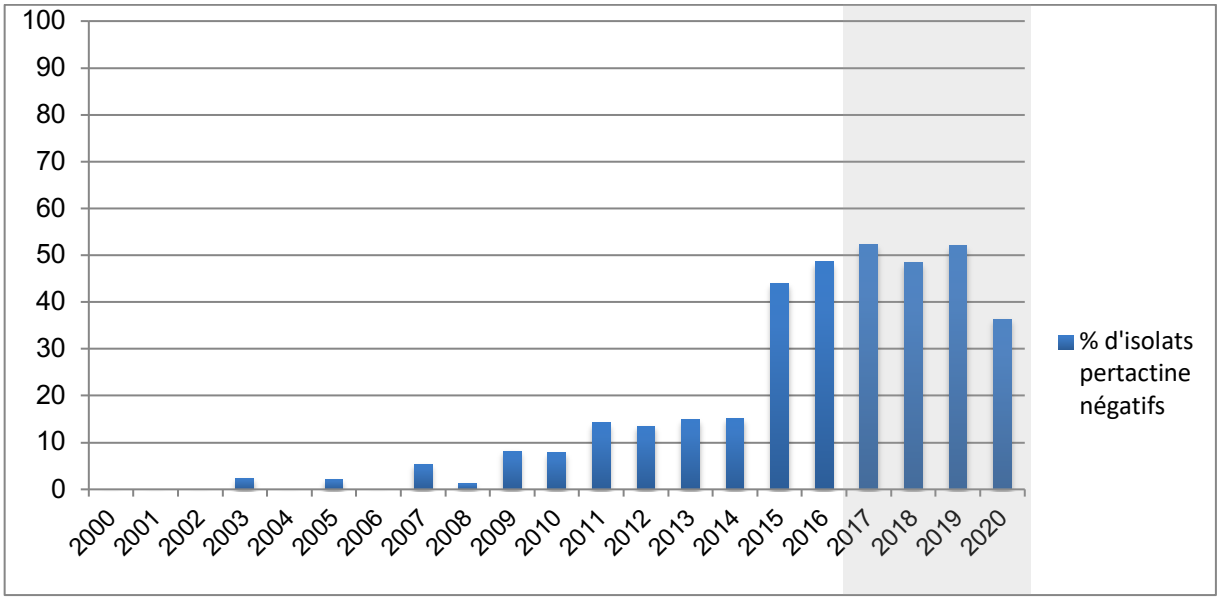
Un aspect fondamental de la surveillance des souches de *B. pertussis* est la recherche de la perte de l'expression des protéines antigéniques ciblées par la vaccination (PT, PRN, FHA et les protéines fimbriales FIM2 et FIM3), et en particulier de la pertactine (PRN). Cette perte d'expression et la dissémination de ces souches dans les populations du pathogène peuvent affecter l'efficacité vaccinale, la colonisation asymptomatique et la transmission des souches. La surveillance de la production de ces antigènes se fait par immunoempreinte (Western blot) ou, pour l'adénylate cyclase (facteur de virulence non inclus dans les vaccins coquelucheux), par observation de l'activité hémolytique.

Promoteur de la toxine de pertussis. Entre 2017 et 2020 (0 cas en 2021), la majorité des isolats de *B. pertussis* isolés ont les caractéristiques bactériologiques habituelles concernant la PT et *ptx*P. Tous les isolats de *B. pertussis* analysés sauf un produisent la PT. L'allèle de la sous-unité S1 de la PT est de type *ptx*S1A, en majorité, comme la plupart des isolats circulant depuis 1990. Le promoteur *ptxP* situé en amont de l'opéron PT (codant les différentes sous unités de la toxine de pertussis *ptx)* montre une variation de séquence, avec deux variants, *ptx*P1 et *ptx*P3. Ce dernier pourrait entraîner une augmentation de la production de la toxine de pertussis, ce qui a été interprété comme une réponse à l'immunité vaccinale, bien que cela soit controversé. Depuis 1993, une augmentation régulière des isolats possédant l'allèle *ptx*P3 du promoteur de l'opéron codant la PT, est observée.

Les isolats analysés sur la période 2017-2021 sont quasiment tous *ptx*P3 (à deux exceptions). Un isolat de 2017 et un de 2018 sont du type *ptx*P1. La population est donc stable de ce point de vue.

Pertactine. Entre 2017 et 2020 (0 cas en 2021), la proportion des isolats qui ne produisent pas la pertactine, s'est stabilisé autour de 50%, alors qu'elle était d'environ 15% lors du cycle épidémique de 2012-2013 (**Figure 8**, ci-dessous). Étant donné le faible nombre d'isolats reçus, l'absence de tendance temporelle de cette proportion (voire une apparente baisse sur la période) doit être interprétée prudemment ; dans d'autres pays utilisant les vaccins acellulaires comme les États-Unis ou l'Australie, l'augmentation des pertactine-négatifs s'est poursuivi jusqu'à dépasser 90% (Lefrancq, Bouchez e*t al*., 2022) ; il se peut donc que cette tendance évolutive se poursuive dans les années prochaines en France.

Figure 8 : Pourcentage des isolats de B. pertussis analysés qui ne produisent pas la pertactine. La zone grisée correspond aux années 2017-2020 *(2021 non indiqué car 0 isolat reçu).*

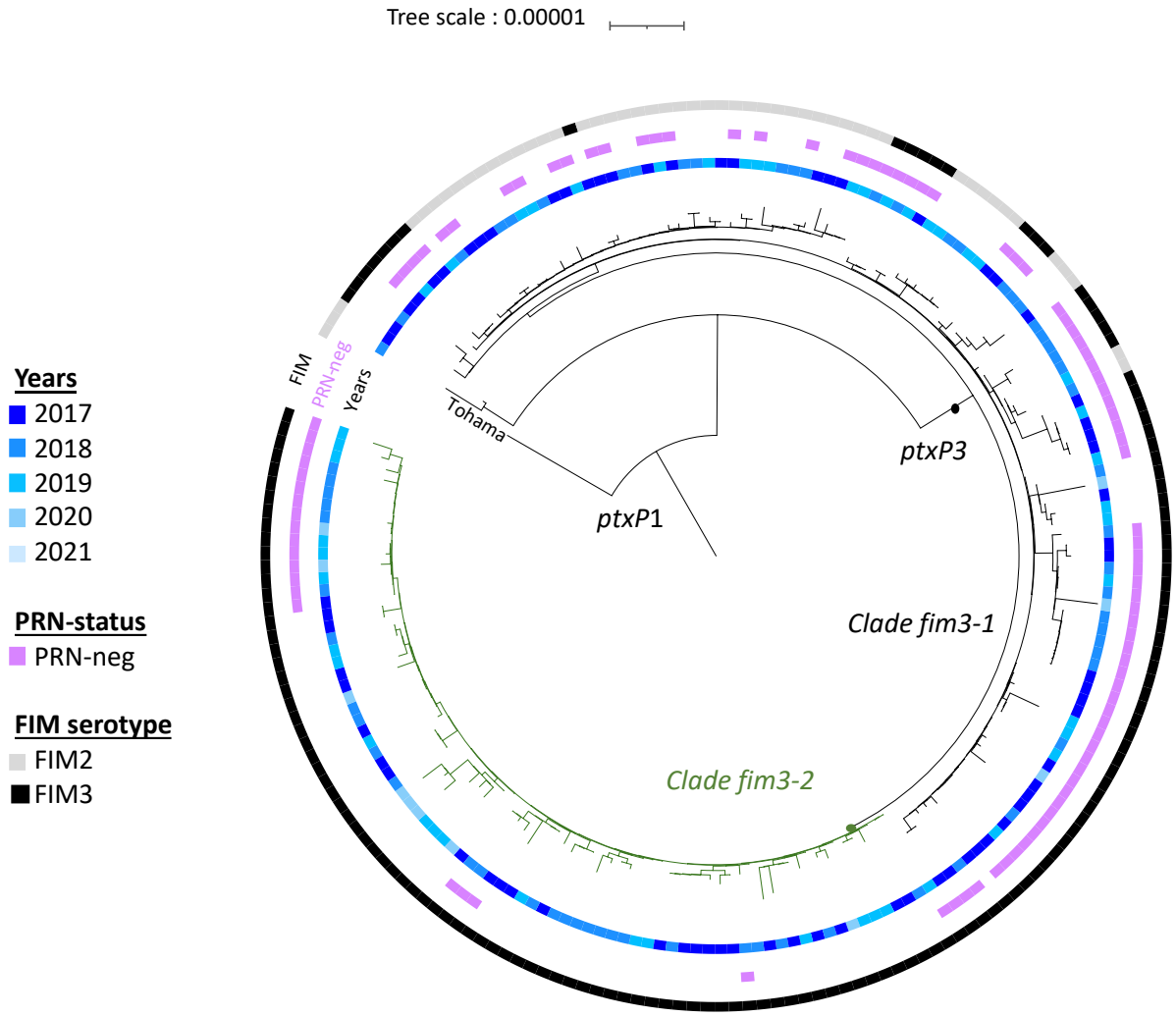


Protéines fimbriales du type 2 et 3. Les isolats de *B. pertussis* peuvent exprimer deux *fimbriae* différentes (FIM2 et FIM3), le plus souvent de manière exclusive, ou très rarement en combinaison. Pour la période 2017-2021, les isolats produisent majoritairement la protéine fimbriale FIM3 (**Figure 9**). Alors que l'on avait observé une diminution de la proportion d'isolats producteurs de FIM3 entre 2011 et 2016 (allant de 92% à 62%), le pourcentage est stable entre 2017 et 2019 (69% en 2017, 70% en 2018, 65% en 2019. Inversement, on note une augmentation sensible des isolats qui produisent FIM2, (3% en 2011) avec 22% en 2017, 30% en 2018 et 35% en 2019. En 2020, les isolats produisent tous FIM3 mais il faut modérer ce résultat du fait du faible nombre d'isolats collectés (n=11).

Diversité phylogénétique des isolats cliniques de B. pertussis. La diversité des souches de *B. pertussis* reçues ou isolées au CNR entre 2017 et 2020 (0 cas en 2021) a été étudiée par notre méthodologie basée sur le cgMLST (Bouchez *et al*, EID 2018). La **Figure 9** présente un arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences des 2038 gènes constituant le schéma cgMLST.

A part 2 isolats de type *ptx*P1, tous les isolats sont de type *ptx*P3. On distingue deux clades principaux, d'isolats de type *ptx*P3 identifiés chacun par leur allèle du gène *fim3* (clade *fim3-1* en noir et clade *fim3-2* en vert). Alors que les isolats produisent toujours majoritairement FIM3, la proportion des isolats qui produisent FIM2 (en gris dans la figure) a augmenté à partir de 2015 et s'est maintenue entre 30 et 35% depuis 2016 essentiellement dans le clade *fim3-1*. Les isolats PRN-négatifs sont présents dans les deux clades (en mauve).

Figure 9 : Arbre phylogénétique déduit de l'analyse génomique des isolats de B. pertussis reçus au CNR entre 2017 et 2021. L'arbre est enraciné sur la souche de référence Tohama



3.3.4 Surveillance des isolats cliniques de *B. parapertussis*

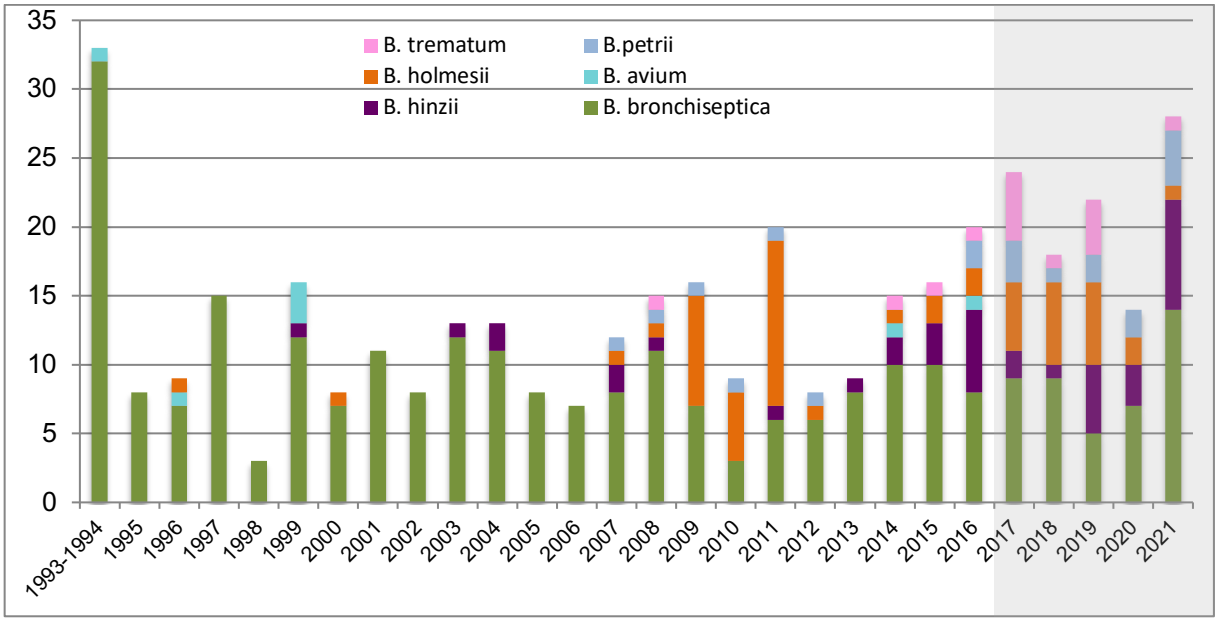
B. parapertussis est aussi responsable de syndromes coquelucheux. Son incidence reste faible comparée à celle de *B. pertussis* (**Figure 6**). Malgré une légère augmentation de ces infections à partir de 2007, nous n'avons pas observé d'augmentation de la circulation des isolats de cette espèce. Il est important de noter que 99% des isolats (87 sur 88) circulant depuis 2007 ne produisent pas la pertactine.

En 2017, une souche de *B. parapertussis* a été isolée d'une hémoculture effectuée chez une enfant de 3 ans, originaire d'Algérie avec fièvre et notion de toux, hospitalisée dans un hôpital parisien. Il est très rare d'isoler une *Bordetella parapertussis* du sang et les investigations sur ce cas ont donné lieu à une publication (Toubiana *et al*., OFID, 2019).

3.3.5 Surveillance des bordetelloses humaines autres que la coqueluche

La surveillance des autres bordetelloses se fait avec l'aide des collègues du CBVH des hôpitaux de France. La répartition des isolats en fonction de l'espèce est présentée dans la **Figure 10**. Il est à noter une hausse du nombre d'isolats reçus au CNR en 2021, année où il est constaté comme en 2020 une forte diminution des cas de coqueluche.

Figure 10 : Répartition des isolats de Bordetella reçus depuis 1994, hors B. pertussis et B. parapertussis



Infections humaines à B. bronchiseptica

B. bronchiseptica est un agent pathogène du tractus respiratoire de nombreux mammifères, dont l'homme. Chez ce dernier, la bactérie se comporte comme un pathogène opportuniste, atteignant généralement des sujets immunodéprimés ou présentant une atteinte respiratoire préalable. A la différence de *B. pertussis* et *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* peut induire des infections persistantes chez les sujets immunodéprimés.

Entre 2017 et 2021, la surveillance de ces infections s'est poursuivie. Il s'est agi principalement de cas d'infections à *B. bronchiseptica* qui concernent des adultes immunodéprimés, le plus souvent âgés de plus de 50 ans et hospitalisés pour une infection pulmonaire.

En 2017, l'ADN d'une *B. bronchiseptica* a été identifié par PCR spécifique d'espèce faite par notre CNR à partir du prélèvement respiratoire d'une patiente âgée de 9 mois. Le nourrisson avait été amené à l'hôpital pour une toux persistante de 3 semaines sans autre signe clinique après avoir été vu plusieurs fois par son médecin traitant et mis sous traitement antibiotique. Le laboratoire de biologie de l'hôpital nous a envoyé l'ADN positif en PCR avec la cible IS481 pour vérification de l'espèce de *Bordetella*. Il s'est avéré qu'il s'agissait de l'ADN d'une *B. bronchiseptica* possédant le gène IS*481* dans son génome. Ce résultat souligne l'importance des vérifications d'identification que le CNR apporte aux laboratoires.

Il est à remarquer qu'en 2020 et 2021, 4 cas d'infection à *B. bronchiseptica* concernaient des patients co-infectés par le SARS-CoV-2.

Infections à Bordetella holmesii

B. holmesii est une espèce du genre *Bordetella* qui a été décrite pour la première fois en 1995 et qui cause généralement des bactériémies chez des patients immunodéprimés, notamment aspléniques ou drépanocytaires. On ne lui connait pas de réservoir animal. Cette espèce peut aussi être occasionnellement isolée ou détectée, par PCR, à partir de prélèvements respiratoires chez des patients présentant des symptômes coqueluchoïdes.

Entre 2017 et 2021, nous avons reçu 14 souches de *B. holmesii*, toutes isolées d'hémocultures chez des patient(e)s adolescents ou adultes souffrant de différentes pathologies. Pour un des patients, âgé de 19 ans, drépanocytaire, nous avons mis en évidence la présence du matériel génétique de *B. holmesii* dans l'expectoration

En 2018, nous avons reçu pour la première fois une *B. holmesii* isolée chez une enfant âgée de 2 mois qui avait été admise à l'hôpital pour une toux quinteuse avec recrudescence nocturne. La souche de *B. holmesii* a été isolée d'une aspiration naso-pharyngée, à partir de laquelle il est à noter qu'un rhinovirus avait également été détecté par PCR multiplexée faite par le laboratoire hospitalier de virologie.

De plus, une souche a été trouvée chez un patient âgé de 72 ans ayant un épanchement articulaire du genou suite à une chirurgie orthopédique.

Infections à Bordetella hinzii

Bordetella hinzii est responsable d'infections respiratoires chez les oiseaux et parfois chez des rongeurs. Chez l'homme, quelques cas d'infections digestives, pulmonaires et bactériémiques ont été rapportés. Les infections humaines à *B. hinzii* étant rares et mal connues cliniquement et épidémiologiquement, nous détaillons les cas identifiés par le CNR sur la période 2017-2021.

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

En 2018 et 2019, nous avons reçu 6 *B. hinzii* Isolées chez des patient(e)s adultes âgés de plus de 60 ans souffrant d'une infection pulmonaire pour 5 d'entre eux.

En 2020, nous avons reçu 2 *B. hinzii*. Il s'agit d'une part d'un cas d'infection respiratoire post-COVID19 chez un patient âgé de 66 ans et d'autre part d'un cas d'infection urinaire chez un adulte âgé de 38 ans chez qui la souche a été isolée dans l'urine.

En 2021, nous avons reçu majoritairement des souches isolées chez des patient(e)s âgé(e)s de plus de 60 ans et souffrant d'infections respiratoires (n=6). Nous avons reçu une souche isolée dans l'urine d'un adulte ayant une pyélonéphrite aigue. Nous avons également reçu une souche isolée à la fois dans une biopsie de ganglion carcinaire et dans une aspiration

bronchique chez un patient âgé de 82 ans, hospitalisé pour un syndrome inflammatoire persistant.

Infections à Bordetella trematum

La première description de *B. trematum* a été faite en 1996. La bactérie avait été isolée pour la première fois à partir d'infections auriculaires chroniques. Elle est aussi isolée, bien que rarement, dans des cas de bactériémies ou d'ulcères chroniques. Les infections humaines à *B. trematum* étant peu fréquentes et mal connues cliniquement et épidémiologiquement, nous détaillons les cas identifiés par le CNR sur la période 2017-2021.

En 2017, nous avons reçu 5 souches isolées chez des patients adultes :
- Chez un patient âgé de 42 ans ayant une mucoviscidose, la souche a été isolée à partir d'une aspiration bronchique. Le patient avait précédemment eu une transplantation pulmonaire.
-Chez une patiente, âgée de 64 ans qui avait été hospitalisée en réanimation pour exacerbation d'une BPCO. La souche a été isolée à partir de l'extrémité d'un cathéter mis en culture.
- Une souche a été isolée à partir de la plaie d'ulcère chez un patient âgé de 68 ans et nous a été envoyée par un laboratoire de biologie médicale de ville.
- Chez une patiente âgée de 70 ans, la souche a été isolée à partir d'un écouvillon rectal. La bactérie a été trouvée fortuitement à la suite d'un programme de dépistage systématique d'un portage digestif de BMR dans le cadre de son hospitalisation en réanimation. Le portage digestif à *B. trematum* est peu documenté.
- Enfin, une souche été isolée d'une hémoculture d'une patiente âgée de 90 ans qui avait été hospitalisée pour un ictère sur hépatopathie chronique.

En 2018, nous avons reçu 1 *B. trematum* isolée chez un patient âgé de 55 ans paraplégique, ayant plusieurs escarres. La souche a été isolée d'une escarre du sacrum.

Nous avons reçu 4 souches en 2019. Une souche a été isolée chez un patient âgé de 17 ans souffrant d'otite chronique dont l'état ne nécessitait pas une hospitalisation. Une souche a été isolée d'une lésion cutanée chez un patient âgé de 24 ans, qui a été hospitalisé pour brûlures corporelles. Une souche a été isolée à partir d'une culture de liquide péritonéal chez un patient de 71 ans, sous dialyse péritonéale. Enfin, une souche a été isolée dans le liquide péritonéal chez un patient âgé de 69 ans dans le cadre d'une péritonite.

En 2021, nous avons reçu 1 *B. trematum* isolée chez une patiente, âgée de 75 ans, ayant une ostéo-arthrite de l'orteil. La souche a été isolée d'un fragment osseux.

Infections à Bordetella petrii

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

Entre 2017 et 2021, nous avons reçu 7 souches isolées chez des patients séniors souffrant d'une infection pulmonaire chronique et 4 souches isolées chez des jeunes adultes/adulte ayant une mucoviscidose.

De plus, nous avons reçu en 2018 1 souche isolée chez un patient, âgé de 70 ans, souffrant d'une otite chronique et ayant une co-infection avec un *Staphylococcus aureus*. L'isolat a été envoyé au CNR par un LABM insulaire.

3.4 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS

Réseau EUPertStrain

Le CNR contribue activement au réseau européen de laboratoires de référence **EuPertStrain.** Le réseau se réunit une fois par an lors d'un symposium pour échanger sur le diagnostic, l'épidémiologie, l'évolution et l'immunité de la coqueluche. Dans ce cadre, nous comparons les souches circulantes avec nos homologues européens. Dans les périodes antérieures à 2017, le CNR a participé aux études EUpert I-IV qui ont consisté à caractériser temporellement les isolats de *B. pertussis* collectés entre 1998 et 2015 dans 9 laboratoires de référence européens (Barkhof *et al*., Eurosurveillance, 2018 ; Voir section 4).

Dans le cadre du réseau EuPertStrain, nous avons contribué au cours des mandats passés, aux travaux montrant que les isolats actuels de *B. pertussis* diffèrent de ceux qui circulaient lors de la vaccination à germe entiers et lors de l'ère prévaccinale, à l'échelle européenne (Van Gent *et al*. 2015, European SCM 34:821-830) et mondiale (Bart *et al*. 2014, MBio 5(2):e01074-14).

Depuis 2007, des isolats ne produisant plus l'antigène vaccinal pertactine (PRN) sont observés en France (Bouchez *et al*. 2009, Vaccine 27(43):6034-41 ; Hegerle *et al*. 2012, CMID 18: E340-6 ; Bouchez et al. 2015 Vaccines Sept 14 ;3(3) :751-70). Nous avons observé cette évolution des souches en France et avons contribué à la décrire dans d'autres pays utilisant les vaccins acellulaires comme la Finlande (Barkoff *et al.* 2012, CVI 19:1703-4) ou l'Australie (Lam *et al*. 2014, EID 20:626-633).

Une nouvelle étude réalisée durant le mandat 2017-2022 a mis en évidence une augmentation de la proportion des souches de *Bordetella pertussis* qui ne produisent plus la pertactine, à l'échelle européenne ; Ce travail a fait l'objet d'une publication (Barkhof *et al*., Eurosurveillance, 2019 ; Voir section 4).

Par ailleurs, le CNR a pris en charge dès 2016, un projet de comparaison des souches européennes par séquençage génomique. Ce travail a abouti récemment à une publication (Lefrancq, Bouchez *et al*., Science Transl. Med., 2022) résumée dans un article du journal Le Monde (https://www.lemonde.fr/sciences/article/2022/05/11/les-lecons-des-vaccins-

contre-la-coqueluche_6125551_1650684.html). Grace à l'analyse de données issues de plus de 3 000 génomes provenant de 23 pays du monde et couvrant une période de 85 ans, il a été possible de caractériser la façon dont *B. pertussis* se propage à l'intérieur et entre les pays et il a été estimé que 5 à 10 ans étaient nécessaires pour que les souches européennes soient distribuées de façon homogène. Les génotypes majoritaires de ptxP et de fim3 sont ainsi retrouvés dans ces pays. Cette étude a aussi apporté un éclairage transversal sur les pressions évolutives exercées par les vaccins en montrant que les vaccins acellulaires exercent un profil sélectif différent de celui des vaccins à germes entiers, et qui conduit au fil du temps à l'émergence de souches PRN-négatives.

Projet EUpert-LabNet

Nous participons au projet **EUpert-LabNet** (devenu ERLNPert-Net en 2019**)**, visant à coordonner un réseau de laboratoires de référence sur la coqueluche et à intégrer les activités de surveillance microbiologique avec la surveillance épidémiologique. Les objectifs plus spécifiques de ce réseau sont d'évaluer, d'améliorer, d'harmoniser et de diffuser les méthodes de diagnostic et de caractérisation des souches dans les laboratoires de référence européens, en particulier via des EQA. Cette étude est financée par le ECDC. Dans ce cadre, nous avons participé à un EQA en 2021 et avons formé une collègue du laboratoire national de la Santé de Ljubjana en Slovénie, au diagnostic de la coqueluche, en Janvier 2017. Nous avons également participé à plusieurs réunions de ce réseau (Oslo, Copenhague, Rome, Turku - en distanciel). En 2020, notre CNR a organisé la réunion annuelle en visioconférence.

Les formations et réunions de ce réseau ont été impactées par la crise COVID19 mais les activités reprennent actuellement, avec 1/ un EQA passé avec succès pour la détection des souches pertactine-négatives et leurs sérotypes ; et 2/ un EQA pour la détection moléculaire de la résistance aux macrolides (en cours).

Par ailleurs, nous avons participé dans le cadre de ce projet, à une étude de séroépidémiologie permettant d'estimer la circulation de l'agent de la coqueluche dans les populations adultes à l'échelle Européenne décrite plus en détails ci-dessous (Berbers et al., Nat. Comms., 2021).

Etude séro-épidémiologique

Le CNR a participé dans le cadre du projet **EUPert-Labnet** à une étude européenne de séro-épidémiologie qui avait pour objectif de déterminer la séroprévalence des anticorps anti-Diphtérie/Tétanos/Coqueluche dans l'Union européenne (UE) et dans l'Espace économique européen (EEE) dans les tranches d'âge de 40 à 49 ans et de 50 à 59 ans. Les 18 pays participants ont chacun collecté environ 500 sérums entre 2015 et 2018 qui ont été analysés pour les anticorps spécifiques aux IgG-DTC. La proportion de sérums contenant des taux d'anticorps contre la toxine de pertussis ≥ 100 UI / ml, indiquant une exposition récente à la coqueluche, était comparable pour 13 des 18 pays, variant entre 2,7 et 5,8%. En conclusion

de cette étude, la séroprévalence de la coqueluche dans ces groupes d'âge indique une circulation de *B. pertussis* à travers l'UE / EEE (Berbers *et al.*, Nature Communications 2021).

Projet Pertinent

Enfin, nous avons participé au projet **Pertinent** (Pertussis in Infants European Network) de surveillance de la coqueluche à l'échelle européenne qui a démarré en 2016. Cette étude était financée par le ECDC. Les objectifs du projet étaient d'estimer le poids de la coqueluche chez les nourrissons hospitalisés âgés de moins d'un an, et d'estimer l'efficacité du vaccin contre l'hospitalisation. Nous avons contribué à la validation des données biologiques pour une vingtaine de centres hospitaliers français qui font partie du réseau RENACOQ et qui participaient à Pertinent. Cette étude observationnelle visait à estimer l'incidence annuelle de la coqueluche par site (République Tchèque, France, Irlande, Italie, Norvège, régions de Catalogne et de Navarre en Espagne) de 2016 à 2018 et les tendances respectives entre 2017 et 2018. Les cas de coqueluche ont été décrits, y compris leur sévérité. Un protocole générique a été développé pour harmoniser les pratiques entre les sites. Les cas étaient des nourrissons hospitalisés testés positifs pour *B. pertussis* par PCR ou culture. Les 7 sites ont recueilli des données démographiques, cliniques, de laboratoire, le statut vaccinal et les facteurs de risque/de protection. L'incidence annuelle a été estimée en divisant le nombre de cas par la population captée. Entre décembre 2015 à décembre 2018, il a été identifié 469 cas (247 mâles ; 53%). L'âge médian, le poids à la naissance et l'âge gestationnel étaient de 2,5 mois, 3 280 g et 39 semaines. Trente cas (6%) avaient une présentation atypique soit avec toux ou cyanose uniquement, soit avec absence de symptômes de type coquelucheux. Sur 330 cas avec information, 83 (25%) ont été admis dans des unités de soins intensifs dont cinq nourrissons décédés trop jeunes pour être vaccinés. L'incidence semble avoir diminué entre 2017 et 2018 dans tous les sites sauf un. Une surveillance renforcée de la coqueluche hospitalisée en Europe est essentielle pour suivre l'épidémiologie de la coqueluche et la charge de morbidité. Cette étude a fait l'objet d'une publication (Merdrignac *et al.*, EuroSurveillance, 2021 ; voir section 4).

3.5 ALERTE

Lors de cas groupés de coqueluche, le CNR prévient Santé publique France et les ARS. Les alertes sont heureusement rares :

En février 2017, nous avons reçu des échantillons en provenance d'un laboratoire de biologie de la région PACA suite au décès d'un nouveau-né survenu environ 2 semaines après sa sortie de la maternité d'un CH de la région. L'hôpital a procédé à un dépistage de la coqueluche parmi le personnel de la maternité en faisant des PCR dont plusieurs se sont avérées positives. Le personnel de la maternité avait été en contact avec la mère qui toussait mais n'avait pas été traitée. Nous avons effectué des PCR de contrôle et des sérologies en étroite collaboration

avec le laboratoire de biologie de l'hôpital et l'ARS PACA. Nous avons confirmé que la maman avait la coqueluche lorsqu'elle est venue pour accoucher à la maternité.

En novembre 2017, SpF (via la CIRE Océan Indien) a prévenu le CNR d'une recrudescence de cas de coqueluche à Mayotte. Sur les 57 cas suspects constatés depuis le début de l'année 2017, 10 cas confirmés ont été rapportés chez des nourrissons de moins de 1 an hospitalisés, incluant 1 décès chez un prématuré de 32 semaines. Le laboratoire de biologie médicale du CH de Mamoudzou (CHM) sous-traite la PCR au laboratoire CERBA situé en région parisienne. L'envoi des échantillons en métropole prend du temps (10 jours en moyenne), ce qui peut être dommageable en cas de situation d'urgence. A la demande de l'ARS Océan Indien, nous avons pris contact avec le laboratoire de biologie médicale du CHM afin de l'aider à mettre en place la PCR coqueluche en leur transférant notre technique de référence. Nous avons donc envoyé les modes opératoires et des ADN (contrôles positifs de référence) afin de valider la PCR. En 2018, le laboratoire mahorais a mis en place la culture et la PCR en temps réel pour le diagnostic de la coqueluche. En octobre 2018, à la suite de suspicions de nouveaux cas de coqueluche, le laboratoire mahorais a identifié une souche de *B. pertussis* chez un nourrisson et sa maman ainsi qu'une souche de *B. parapertussis* chez un nourrisson d'un autre foyer. Les isolats et ADNs ont été envoyés au CNR qui a confirmé les résultats obtenus par le laboratoire de l'hôpital de Mamoudzou.

Dans ce contexte d'épidémie de coqueluche à Mayotte, l'HAS avait émis une recommandation concernant la vaccination contre la coqueluche chez la femme enceinte dans un contexte épidémique à Mayotte, en Mars 2018.

Comme mentionné dans la section 3.3.6, le CNR a alerté SpF de l'augmentation inquiétante du nombre de PCR coqueluche positives à partir de mars 2017 dans plusieurs régions françaises. Les données ont été fournies par le laboratoire CERBA puis Eurofins Biomnis et analysées par notre CNR afin de suivre les tendances.

En 2018, nous avons reçu des échantillons de cas de coqueluche en école primaire qui ont été signalés fin novembre 2018. Le CNR a effectué les PCR de vérification pour confirmer l'espèce de *Bordetella* mais pour un des trois cas, nous avons identifié l'ADN de l'espèce *B. bronchiseptica*. Il s 'agissait d'un garçon âgé de 4 ans.

En 2018, SpF nous a informé de plusieurs cas de coqueluche dans une crèche du 17ème arrondissement de Paris. Il s'est avéré que la bactérie responsable des 4 cas de coqueluche n'était pas *B. pertussis* mais *B. parapertussis*. Nous avons pu confirmer l'espèce *parapertussis* avec notre PCR spécifique FLA.

En 2019, SpF nous a informé des cas groupés de coqueluche dans plusieurs écoles maternelles. Le CNR a été sollicité pour confirmer l'espèce de *Bordetella*. Nous détaillons plus particulièrement deux signalements :

Les investigations faites conjointement par SpF (BFC et DMI, St Maurice) et le CNR concernant des cas groupés dans une école maternelle, en Côte d'Or, ont fait l'objet d'un poster lors des JNI qui se sont déroulées à Poitiers, du 09 au 11 septembre 2020. Le CNR avait reçu les prélèvements des 3 PCR positives en LBM et avait pu confirmer la détection moléculaire de *B. pertussis* pour un des prélèvements.

A la suite d'une demande de vérification par le LBM Eurofins Biomnis d'échantillons pour lesquels il avait été détecté soit l'ADN de *B. parapertussis* ou à la fois l'ADN de *B. pertussis* et *B. parapertussis*, il s'est avéré que ces cas concernaient des enfants (à jour de leur vaccination) d'une même école maternelle localisée en Isère. Le CNR a effectué les PCR de vérification sur les 5 échantillons envoyés par le LBM et a confirmé la présence des 2 espèces dans 2 échantillons. Les 3 autres échantillons contenaient uniquement l'ADN de *B. parapertussis.* Il est à souligner que les cas de co-infection à *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont peu fréquents.

4. LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET ENSEIGNEMENTS

4.1 PUBLICATIONS NATIONALES

2011

1. Zouari A., Smaoui H., Njamkepo E., Mnif K., Ben Jaballah N., Bousnina S., Barsaoui S., Sammoud A., Ben Becher S., Guiso N., Kechrid A. The re-emergence of pertussis in Tunisia. **Med. Mal. Infect.** (2011) 41:97-101
2. Lasserre A., Laurent E., Turbelin C., Hanslik T., Blanchon T., Guiso N. *Pertussis* incidence among adolescents and adults surveyed in general practices in the Paris area, France, May 2008 to March 2009 **Eurosurveillance** (2011) 16(5) pii 19783 du 03 février 2011
3. Guiso N. Coqueluche de l'adulte. **La revue du praticien, Médecine Générale** (2011) 25(862):405-406

2012

4. Guiso N. Coqueluche: limites du diagnostic par PCR. **Flash Info Maladies Infectieuses** (InVS) (2012) 10:2
5. Guiso N. La coqueluche (2013) **EMC- Maladies Infectieuses** Vol. 10: (1) 8-017-B-10

2013

6. Guiso N. La coqueluche : physiopathologie, diagnostic et prévention (2013) **EMC-Maladies Infectieuses** Vol. 10: (1) 8-017-B-10

2014

7. Guiso N. La coqueluche du nourrisson de l'enfant et de l'adulte. **EMC-Maladies Infectieuses** (2014)
8. Guiso N. Facteurs de virulence de *Bordetella* pertussis et *Bordetella parapertussis* et diagnostics biologiques de la coqueluche. **Archives de Pédiatrie** (2014)

2015

9. Guiso N and Gaillat J. Coqueluche. **La revue du praticien** (2015)
10. Guiso N. Bordetella spp. **REMIC** (2015)

2018

11. Guiso N. Guillot S. Bordetella spp. **Rémic** 5ème Edition

2021

12. Guillot S. Bordetella spp. **Rémic** 6ème Edition

4.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

2011

1. Guiso N., Berbers G., Fry N.K., He Q., Riffelmann M., Wirsing von Konig C. H. and the EUPertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of *pertussis*: recommandations from EU reference laboratories. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** (2011) 30(3):307-12

2. Guiso N., Wirsing von Konig C.H., Forsyth K., Tan T., Plotkin S.A. The Global *Pertussis* Initiative: Report from a round table meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 janvier 2010. **Vaccine** (2011)29:1115-1121

3. Le Coustumier A., Njamkepo E., Cattoir V., Guillot S., Guiso N. Human *Bordetella* petrii infection and long-lasting persistence inside the host. (2011) **Emerg. Inf. Dis.** 17(4):612-61

4. Basheer SM., Guiso N., Tirsoaga A., Caroff M., Novikov A. Structural modifications occurring in lipid A of *Bordetella* bronchiseptica clinical isolates as demonstrated by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (2011) **Mass spectrometry** 25:1075:1081

5. Lasserre A., Laurent E., Turbelin C., Hanslik T., Blanchon T., Guiso N. *Pertussis* incidence among adolescents and adults surveyed in general practices in the Paris area, France, May 2008 to March 2009 **Eurosurveillance** (2011) 16(5) pii=19783

6. Zepp F., Heininger U., Mertsola Y., Bernatowska E., Guiso N., Roord J., Tozzi AE., Van Damme P. Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe. (2011) **Lancet Infect. Dis.** 11(7):557-570

7. Moissenet D., Leverger G. ,Merens A., Bonacorsi S., Guiso N., Vu-Thien H. Case report Septic arthritis caused *by Bordetella holmesii* in an adolescent with a chronic haemolytic anaemia. (2011) **J. Medical Microbiol.** 60:1705-1707

8. Lanotte P., C Plouzeau C., Burucoa C., Grelaud C., Guillot S., Guiso N., Garnier F. Evaluation for four commercial real-time PCR assays for the detection 1 of *Bordetella* in nasopharyngeal aspirates (2011) **J. Clin. Microbiol**. 49(11):3943-3946

9. Njamkepo E., Bonacorsi S., Debruyne M., Gibaud S.A., Guillot S., Guiso N. Significant finding of *Bordetella* holmesii DNA in nasopharyngeal samples for French patients with suspected pertussis (2011) **J. Clin. Microbiol**. 49(12):4347-4348

10. Guiso N., Liese J., Plotkin S. The Global *Pertussis* Initiative: meeting report from the fourth regional roundtable meeting, France, April 14-15, 2010. **Hum Vaccin**. (2011) Apr;7(4):481- 8

11. Bille E., Lesage F., Guiso N., Quesne G., Berche P., Le Monnier A. *Bordetella* bronchiseptica-associated acute chest syndrome in a child with sickle cell disease. **Arch Pediatr**. (2011) 18(1):41-4

12. Bouchez V., Brun D., Dore G., Njamkepo E., Guiso N. *Bordetella parapertussis* isolates not expressing pertactin circulating in France.**Clin Microbiol Infect**. (2011) May;17(5):675-82

2012

13. Zouari, A., Touati, A. Smaoui H., Brun D., Kasdaghli K., Menif K., Ben Jaballah N., Ben Hassen E., Guiso N., Kechrid A. Dual infection with *Bordetella* pertussis and Mycoplasma pneumoniae in three infants: case reports (2012) **Infection** 40:213-217.

14. Zouari A., Smaoui H., Brun D., Njamkepo E., Sghaier S., Zouari E., Felix R., Menif K., Ben Jaballah N., Guiso N., Kechrid A. Prevalence of *Bordetella* pertussis and *Bordetella parapertussis* infections in Tunisian hospitalized infants: result of a 4-year prospective study (2012) **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** 72:303-317

15. Njamkepo E., Bonacorsi S., Debruyne M., Gibaud SA., Guillot S., Guiso N. Reply to "*Bordetella* holmesii in nasopharyngeal samples from chilean patients with suspected *Bordetella pertussis* infection". (2012) **J. Clin Microbiol**. 50(4):1506

16. Guillot S., Descours G., Gillet Y., Etienne J., Floret D., Guiso N. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in Newborn girl, France. (2012) **Emerg Infect Dis**. 18(6):966-968

17. Hegerle N., Paris A-S., Brun D., Dore G., Njamkepo E., Guillot S., Guiso N. Evolution of French *Bordetella* pertussis and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of

Bordetella not expressing pertactin. (2012) **Clin. Microbiol. Infect.** 18(9): E340-E346

18. Barkoff A.M., Mertsola J., Guillot S., Guiso N., Berbers G., He Q. Appearance of *Bordetella* pertussis strains not expressing vaccine antigen pertactin in Finland (2012) **Clin. Vaccine Immunol.** 19(10):1703-1704

19. He Q., Barkoff AM, Mertzola J., Glismann S., Bacci S., on behalf of the European *Bordetella* expert group (EUpertstrain), the European surveillance network for vaccine-preventable diseases (EUVAC.NET). High heterogeneity in methods used for the laboratory confirmation of pertussis diagnosis among European countries, 2010: integration of epidemiological and laboratory surveillance must include standardisation of methodologies and quality assurance (2012) **Eurosurveillance** 17(32):20239

20. Guiso N. Specific biological diagnoses are needed to determine the durability of *Pertussis* vaccine induced immunity (2012) **Clin. Infect. Dis.** 55:1433-1434

2013

21. Advani R., Hallander H., Dalby T., Krogfelt K., Guiso N., Njamkepo E., Wirsing von köenig C H., Riffelmann M., Mooi F., Sandven P., Lutyńska A., Fry N., Mertsola J., He Q. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella* pertussis isolates circulating in Europe in 1998 to 2009 (2013) **J. Clin. Microbiol**. 51(2):422-428

22. Tizolova A., Guiso N., Guillot S. Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for biological diagnosis of pertussis syndrome (2013) **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**. 32(1):89-96

23. Bodilis H., Guiso N. Clinical symptoms in infants less than 6 months old infected by *Bordetella pertussis* isolates expressing or not expressing pertactin. **Emerg. Infect. Dis**. 19(3):471-474

24. Hegerle N., Rayat L., Dore G., Zidane N., Bedouelle H., Guiso N. In-vitro and in-vivo analysis of the production of the *Bordetella* type three secretion system effector A in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Microbes Infect.** 2013 May; 15(5):399-408.

25. Guiso N. How to fight *pertussis*? **Ther. Adv. Vaccines** (2013) 1 (2):59-66

26. Bouchez V., Guiso N. *Bordetella holmesii*: comparison of two isolates from blood and a respiratory sample. **Adv. Infect. Dis.** (2013) 3(2):123-133

27. Albitar-nehme S., Basheer S.M., Njamkepo E., Brisson J.R., Guiso N., Caroff M. Comparison of Lipopolysaccharide structures of *Bordetella pertussis* clinical isolates from pre-and-post-vaccine era. **Carbohydrate research** (2013) 378:56-62

28. Nguyen L.B., Epelboin L, Gabarre J., Lesco M., Guillot S., Bricaire F., Caumes E., Guiso N. Recurrent *Bordetella holmesii* bacteremia and nasal carriage in a patient receiving rituximab. **Emerg. Inf. Dis.** (2013) 19(10):1703-1705

29. Guiso N. *Bordetella holmesii* and pertussis diagnosis: authors' reply **Pathology** (2013) 45(5):531-5321

30. Hegerle N., Guiso N. Epidemiology of whooping cough and typing of *Bordetella pertussis*. **Future Microbiology** (2013) Nov 8(11):1391-1403

2014

31. Guiso N. *Bordetella pertussis*: Why is it still circulating? **J. of Infection** (2014) - Vol. 68:S119–S124.

32. Dinu S., Guillot S., Dragomirescu CS., Brun D., Lazar S., Vancea G., IOnescu G., Gherman MF., Bjerkestrand AF., Ungureanu V., Guiso N., and Damian M. Whooping

cough in South-East of 1 Romania-a one-year study. **Diag. Microbiol. and Infect. Dis**. (2014) 78(3):302-6

33. Tizolova A., Brun D., Guiso N. and Guillot S. Development of Real-Time PCR assay for differential detection of *Bordetella* bronchiseptica and *Bordetella parapertussis*. **Diag. Microbiol. and Infect. Dis**. (2014), 78(4):347-51

34. Lam C., Octavia S., Ricafort L., Sintchenko V., Gilbert GL., Wood N., Mc Intyre P., Marshall H., Guiso N., Keil AD., Lawrence A., Robson J., Hogg G., and Lan R. Rapid increase in Pertactin-deficient *Bordetella* pertussis Isolates, Australia. **Emerging infect. Dis**. (2014), 20(4):626-633

35. Hegerle N. and Guiso N. Antibody-mediated inhibition of ***Bordetella*** pertussis adenylate cyclase-haemolysin-induced macrophage cytotoxicity is influenced by variations in the bacterial population. **Microbiology** (2014) 160(Pt5):962-9.

36. Barkoff M.G., Guiso N., Guillot S., Xing D., Markey K., Berbers G., Mertsola J., He Q. A rapid ELISA-based method for screening *Bordetella* pertussis strain production of antigens included in current acellular pertussis vaccines. J. **Immunol. Methods** (2014) 408:142-148

37. Bart MJ., Harris SR., Advani A., Arakawa Y., Bottero D., Bouchez V., Cassiday PK., Chiang CS., Dalby T., Fry NK., Gaillard ME., Van gent M., Guiso N., Hallander H., Harvill ET., He Q., Van der Heide HG., Heuvelman K., Hozbor DF., Kamachi K., Karataev GI., Ian R., Lutynska A., Maharjan P., Mertsola J., Miyamura T., Octavia S., Preston A., Quail MA., Sintchenko V., Stefanelli P., Tondella ML., Tsang RS., Xu Y., Yao SM., Zhang S., Parkhill J., Mooi FR. Global Population Structure and Evolution of *Bordetella* pertussis and Their Relationship with vaccination. **MBio**. (2014) 22;5 (2):e01074-14.

38. Hegerle N. and Guiso N. *Bordetella* pertussis and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines **Expert Review of Vaccines**. (2014) Vol. 13 (9):1135-114

39. Guiso N. and Hegerle N. Other *Bordetella*'s, lessons for and from pertussis vaccines. **Expert Review of Vaccines**. (2014) 13(9):1125-33

40. Guiso N. *Pertussis* vaccination and whooping cough. And now what? **Expert Review of Vaccines**. (2014), vol 13(10):1163-5

41. Hegerle N., Dore G., Guiso N. Pertactin deficient *Bordetella* pertussis present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. **Vaccine**, (2014), 32 (2014):6597-6600

42. Guiso N. *Bordetella*. **Molecular Medical Microbiology.** Volume III (2014)

2015

43. Polak M., Zawadka M., Mosiej E., Rabczenko D., Augustynowicz E., Guiso N. And Lutynska A. Colonization of the lungs of naïve mice or mice immunized with pertussis whole-cell vaccines by *Bordetella* pertussis clinical isolates differing by PFGE types. **Arch. Immunol. Ther. Exp**. (2015) 63:155-60

44. Van gent M., Heuvelman K., Van der heide HG., Hallander H., Advani R., Guiso N., Wirsing von konig C., Vestrheim D., Dalby T., Fry N., Pierard D., Detemmerman l., Zavadilova J., Fabianova K., Logan C. Analysis of *Bordetella* pertussis clinical isolates circulating in European countries from 1998-2012**. JCMID**, (2014) 34(4):821-830

45. Tubiana S., Belchior E., Guillot S., Guiso N., Lévy-Bruhl D.; Renacoq Participants. Monitoring the Impact of Vaccination on Pertussis in Infants Using an Active Hospital-based Pediatric Surveillance Network: Results from 17 Years' Experience, 1996-2012, France. **Pediatr Infect Dis J.** (2015) Aug;34(8):814-20

46. Bouchez V., Guiso N. *Bordetella* pertussis, B. *parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough.**Pathog Dis**. (2015) Oct;73(7):ftv055

47. Bouchez V., Hegerle N., Strati F., Njamkepo E., Guiso N. New Data on Vaccine Antigen Deficient *Bordetella* pertussis Isolates. **Vaccines (Basel)**. (2015) Sep 14;3(3):751-70

48. Fabre A., Dupin C., Bénézit F., Goret J., Piau C., Jouneau S., Guillot S., Mégraud F., Kayal S., Desrues B., Le Coustumier A., Guiso N. Opportunistic Pulmonary *Bordetella* hinzii Infection after Avian Exposure. **Emerg. Inf. Dis.** (2015) Dec;21(12):2122-6.

49. El Khatib N., Ferroni A., Le Bourgeois M., Chedevergne F., Clairicia M., Avril H., Guiso N., Sermet-Gaudelus I. Persistent *Bordetella* bronchiseptica infection in a child with cystic fibrosis: Relationship to bacterial phenotype. **J Cyst Fibros. (**2015) Sep;14(5):E13-5

2016

50. Basheer S.M., Bouchez V., Novikov A., Augusto L.A., Guiso N., Caroff M. Structure activity characterization of Bordetella petrii lipid A, from environment to human isolates **Biochimie**. (2016) Jan; 120:87-95

51. Guillot S. and Guiso N. Follow-up of External Quality Controls for PCR-Based Diagnosis of Whooping Cough in a Hospital Laboratory Network (Renacoq) and in Other Hospital and Private laboratories in France.**J. Clin. Microbiol**. (2016) 54(8):2169-71

2017

52. Guillot S. and Guiso N. Follow-up of External Quality Controls for PCR-Based Diagnosis of Whooping Cough in a Hospital Laboratory Network (Renacoq) and in Other Hospital and Private laboratories in France.**J. Clin. Microbiol**. (2016) 54(8):2169-71

53. Guiso N., Levy C., Romain O., Guillot S., Werner A., Rondeau MC., Béchet S., Cohen R. Whooping cough surveillance in France in pediatric private practice in 2006-2015. Vaccine. 2017 ; 35(45): 6083-6088

54. Bouchez V, AlBitar-Nehmé S, Novikov A, Guiso N, Caroff M. Bordetella holmesii: Lipid A Structures and Corresponding Genomic Sequences Comparison in Three Clinical Isolates and the Reference Strain ATCC 51541. Int J Mol Sci. 2017 May 18; 18(5)

55. Otsuka N., Guiso N., Bouchez V. The length of poly(C) stretch in the Bordetella pertussis Pfim3 promoter determines the vag or vrg function of the fim3 gene. Microbiology. 2017 Sep; 163 (9):1364-1368

56. Bouchez V., Douché T., Dazas M., Delaplane S., Matondo M., Chamot-Rooke J., Guiso N. Characterization of Post-Translational Modifications and Cytotoxic Properties of the Adenylate-Cyclase Hemolysin Produced by Various Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis Isolates. Toxins (Basel). 2017 Sep 26;9 (10)

2018

57. Barkoff AM., Mertsola J., Pierard D., Dalby T., Vermedal Hoegh S., Guillot S., Stefanelli P., van Gent M., Berbers G., Vestrheim DF., Greve-Isdahl M., Wehlin L., Ljungman M, Fry NK., Markey K., Auranen K., He Q. Surveillance of circulating *Bordetella pertussis* strains in Europe during 1998-2015. J Clin Microbiol. 2018 Feb. pii: JCM.01998-17. doi: 10.1128/JCM.01998-1

58. Bouchez V, Baines SL, Guillot S, Brisse S. Complete Genome Sequences of Bordetella pertussis Clinical Isolate FR5810 and Reference Strain Tohama from Combined Oxford Nanopore and Illumina Sequencing. Microbiol Resour Announc.

2018;15;7(19)

59. Bouchez V, Guglielmini J, Dazas M, Landier A, Toubiana J, Guillot S, Criscuolo A, Brisse S. Genomic Sequencing of Bordetella pertussis for Epidemiology and Global Surveillance of Whooping Cough. Emerg Infect Dis. 2018;24(6):988-994

2019

60. Toubiana J., Azarnoush S., Bouchez V., Landier A., Guillot S., Matczak S., Bonacorsi S., Brisse S. Bordetella parapertussis Bacteremia: Clinical Expression and Bacterial Genomics Open Forum Infect Dis. 2019 Mar 7;6(4):ofz122. doi: 10.1093/ofid/ofz122. eCollection 2019 Apr. PMID: 30976607

61. Barkoff AM., Mertsola J., Pierard D., Dalby T., Hoegh SV., Guillot S., Stefanelli P., van Gent M., Berbers G., Vestrheim D., Greve-Isdahl M., Wehlin L., Ljungman M., Fry NK, Markey K., He Q. Pertactin-deficient Bordetella pertussis isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. Euro Surveillance. 2019 Feb;24(7):1700832. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1700832

62. Ben Fraj I., Bouchez V., Smaoui H., Kechrid A., Brisse S. Genome characteristics of *Bordetella pertussis* isolates from Tunisia. J Med Microbiol. 2019 Sep;68(9):13201323

63. Ben Fraj I., Kechrid A., Guillot S., Bouchez V., Brisse S., Guiso N., Smaoui H. Pertussis epidemiology in Tunisian infants and children and characterization of Bordetella pertussis isolates: results of a 9-year surveillance study, 2007 to 2016. J Med Microbiol. 2019;68(2):241-24

2020

64. Belchior E., Guillot S., Poujol I., Thabuis A., Chouin L., Martel M., Delisle E., Six C., Guiso N., Lévy-Bruhl D. Comparison of whole-cell versus acellular pertussis vaccine effectiveness in school clusters of pertussis, France, 2013. Med Mal Infect. 2020 Oct;50(7):617-619

65. Guillot S., Mizrahi A., Armatys N., Chat L., Le Monnier A., Brisse S., Toubiana J. Low detection rate of Bordetella pertussis using the BioFire FilmArray Respiratory Panel 2plus, Open Forum Infect Dis., ofaa267

66. Wong A, Opinel A, Combes SJ., Toubiana J., Brisse S. Determining Factors for Pertussis Vaccination Policy: A Study in Five EU Countries. Vaccines (Basel). 2020 Jan 26;8(1):46

2021

67. Merdrignac L., Aït El Belghiti F., Pandolfi E., Jané M., Murphy J., Fabiánová K., García Cenoz M., Flem E., Guillot S., Tozzi AE., Carmona G., Habington A., Zavadilová J., Navasués A., Bøås H., Lévy-Brühl D., Ferretti B., Lanaspa M., O'Sullivan N., Křížová P., Fernandino L., Bekkevold T., Hanslik T., Muñoz-Almagro C., Bacci S., Spiteri G., Valenciano M., Moren A; PERTINENT Group; Incidence and severity of pertussis hospitalisations in infants aged less than 1 year in 37 hospitals of six EU/EEA countries, results of PERTINENT sentinel pilot surveillance system, December 2015 to December 2018 . Euro Surveillance. 2021 Jan;26(4):1900762

68. Bouchez V., Guillot S., Landier A., Armatys N., Matczak S., French pertussis microbiology study group, Toubiana J., Brisse S. Evolution of Bordetella pertussis over a 23-year period in France, 1996 to 2018. ; Euro Surveill. 2021 Sep;26(37):2001213

69. Berbers G., van Gageldonk P., Kassteele JV., Wiedermann U., Desombere I., Dalby T., Toubiana J., Tsiodras S., Ferencz IP., Mullan K., Griskevicius A., Kolupajeva T.,

Vestrheim DF., Palminha P, Popovici O., Wehlin L., Kastrin T., Maďarová L., Campbell H., Ködmön C., Bacci S., Barkoff AM., He Q., Circulation of pertussis and poor protection against diphtheria among middle-aged adults in 18 European countries. Serosurveillance Study Team. Nat Commun. 2021 May 17;12(1):2871. doi: 10.1038/s41467-021-23114-y. PMID: 34001895

70. Paireau J., Guillot S., Aît El Belghiti F., Matczak S., Trombert-Paolantoni S., Jacomo V., Taha MK., SaljeH., Brisse S., Levy-Bruhl D., Cauchemez S., Toubiana J. Impact of vaccine schedule change on pertussis epidemiology in France: a modelling study. Lancet Infect Dis 2021; 18: S1473-3099

4.3 COMMUNICATIONS NATIONALES

2011

1. Guiso N.: "Vaccins coquelucheux et encéphalopathie: conséquences au niveau des stratégies vaccinales, du monde médical & de la population". Cycle annuel de séminaire intitulé « La question de la preuve et de la décision en épidémiologie/santé publique » Institut Pasteur Paris, 19-05-2011.

2. Guiso N.: "Détection de l'ADN de *Bordetella holmesii* dans des prélèvements naso-pharyngés de patients atteints de syndromes coqueluchoides". 31ème Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI); Paris, les 1 et 2-12-2011.

2012

3. Guiso N.: "La coqueluche en 2012: Impact sur les adultes". 10 e Journées du Collège National des Sages-Femmes, Issy Les Moulineaux, le 07-02-2012.

4. Guiso N.: "Les rappels de la vaccination: exemple des vaccinations diphtériques et coquelucheuses". Atelier Presse les entreprises du médicament (Leem) Paris, le 7-03-2012.

2013

5. Guiso N.: Réunion annuelle des pneumologues de langue française – « Actualités sur la coqueluche en 2013 » Lille, du 1er au 1er février 2013

6. Guiso N.: 14eme Journées Nationales d'Infectiologie, Session de communications orales thématiques : "Vaccinations et maladies à prévention vaccinale » Actualité de la vaccination coquelucheuse » Clermont-Ferrand, le 12 juin 2013

7. Guiso N.: Journée Parisienne de Pédiatrie. « Diagnostic biologique des infections à Bordetelles : autour d'un cas et à visée épidémiologique » Paris, le 4 octobre 2013

8. Guiso N.: 9e congrès Francophone Pédiatrique de Pneumologie et d'Allergologie « Actualités sur la coqueluche en 2013 » Paris, le 15-11-2013

9. Guiso N.: 6 e séminaire des CNR « Coqueluche: conséquences sur l'épidémiologie de la maladie et de l'émergence d'isolats n'exprimant plus un ou plusieurs antigènes vaccinaux? » Paris, le 28-11-2013

2014

10. Guiso N.: Congrès des Sociétés de Pédiatrie « Bordetella pertussis et Bordetella parapertussis : Facteurs de virulence et diagnostics biologiques » Lyon, 23 Mai 2014

11. Guillot S.: 34e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI) « Evolution des populations de Bordetella pertussis et parapertussis sous pression vaccinale? » Paris, 28-11-2014.

2015

12. Garin B. : 35e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI) « Données récentes dans le diagnostic biologique de la coqueluche » Paris, 14-12-2015.

2017

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

2018

14. Brisse S. et Toubiana J. ont donné en tandem deux conférences dans le cadre des séminaires Quart d'Heure Pasteur - Médecine du Centre de Recherche Translationnelle de l'Institut Pasteur, le 15 mars 2018 :
- Brisse S. : « L'épidémiologie génomique et ses applications à l'agent de la coqueluche »
- Toubiana J. : « Coqueluche : le point de vue de la pédiatre, et scientifique à Pasteur »
Ces deux conférences ont donné lieu à diffusion de deux films de 20 minutes sur YouTube :
Julie Toubiana : https://youtu.be/a7S-AewuBAU
Sylvain Brisse : https://youtu.be/O2_BHpO91HQ

15. Brisse S. : présentation à la journée Inception, Institut Pasteur, le 8 novembre 2018 : « Understanding whooping cough resurgence by a population genomics approach »

16. Toubiana J. : présentation orale aux Journée Nationales d'Infectiologie sur le thème des pièges en infectiologie pédiatrique qui se sont déroulées du 13 au 15 Juin 2018 à Nantes – présentation de la coqueluche maligne.

17. Toubiana J. : dernier auteur d'une présentation orale à la RICAI, le 17 Décembre 2018 : « Recrudescence des cas de coqueluche en 2017 »

2019

18. Toubiana J. : présentation orale à la RICAI qui s'est déroulée le 16 et 17 Décembre 2019 « Coqueluche, Actualités du CNR »

2020

19. Bouchez V. : présentation orale à la RICAI qui s'est déroulée le 14 et 15 Décembre 2020 en visioconférence « Évolution de l'agent de la coqueluche Bordetella pertussis en France - Analyse rétrospective sur les 23 dernières années ».

20. Guillot S. : première auteure de la présentation affichée à la RICAI qui s'est déroulée le 14 et 15 Décembre 2020 en visioconférence « Low Detection Rate of Bordetella pertussis Using the BioFire FilmArray Respiratory Panel 2plus

2021

21. Brisse S. : présentation 'keynote' à la journée du Département de Santé Globale, Institut Pasteur, le 28 octobre 2021 : « L'apport du séquençage génomique Biologie des populations de *Bordetella pertussis* et évolution face à la vaccination »

4.4 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

2011

1. Guiso N. : "Whooping cough surveillance and testing in France" EUVACNet (8th annual

meeting), Berlin, Allemagne, 28 février au 1er mars 2011

2. Guiso N. : "whooping cough surveillance" et "Evolution of *Bordetella* species: any impact of pertussis vaccines" National Public Health, République Tchèque 14-17 avril 2011

3. Guillot S.: "Novelties from human *Bordetella* isolates collected in France" EupertGenomics/EupertStrain congress, Colindale, Angleterre, 16-17 juin 2011

4. Guiso N. : "*Pertussis*-whooping cough in adolescents and adults" Annual meeting SSI, SSHH, Challenge in HIV and SFTRM, Interlaken, Suisse, 24-25 août 2011

5. Guiso N. : 2 presentations "*Pertussis*-whooping cough in modern society", "Laboratory diagnostics of *pertussis*: did we reach our goals?", " 5th International Vilnius Course "Update on Paediatric Infectious Diseases", Vilnius, Lituania 3-4 octobre 2011

6. Hegerle N. : "*Bordetella pertussis* facing vaccine induced herd immunity" 1st International "Microorganisms Facing Their Environment" Conference, Museum National d'Histoire Naturelle – Paris – France, 27-28 octobre 2011

2012

7. Guiso N.: Organisation du congrès ECDC, EUpert-Labnetwork kick off meeting, présentation "EU 2008 Case definition", Paris, France 24-25 janvier 2012

8. Guiso N. : "Coqueluche une préoccupation mondiale" Agence de Médecine Préventive (AMP), Barcelone, Espagne 17 avril 2012

9. Hegerle N., Guillot S. et Guiso N. "Evolution of *Bordetella* pertussis population what can be learnt after a decade of acellular pertussis vaccination in France" EupertGenomics/EupertStrain congress, Oslo, Norvège, 31 mai au 01 juin 2012

10. Guiso N.: 3 présentations "hospital-based surveillance in France: The Renacoq net 1996-2012", "Tools for the surveillance of pertussis" "Why is pertussis still a problem?" GPI Mediterranean Regional Roundtable meeting, Rome, Italie, 9-10 juin 2012

11. Guiso N. : "Why is pertussis still circulating? ", Hot topic in Infection and Immunity of children, Keble college, Oxford, Royaume-Uni 25-27 juin 2012

12. Guiso N. : 3 présentations "Importance du diagnostic biologique de coqueluche pour réaliser une surveillance efficace", "Actualité sur la vaccination coquelucheuse", "Evolution de la stratégie vaccinale suivant les données de surveillance : l'exemple de la France" 4ème journée de Vaccinologie de l'Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Maroc, 11-14 octobre 2012

13. Guiso N. : "Coqueluche une préoccupation mondiale" Expert consultation meeting on pertussis, Barcelone, Espagne 20 novembre 2012

2013

14. Guiso N. Conférence « *Pertussis* : current strategy of prevention, diagnostics, and surveillance ». St Pétersbourg- Russie 8-10 avril 2013

15. Guiso N. 31st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases – ESPID 2013- "2006-2012: Follow-up of *Pertussis* paediatric surveillance, in private practice, in France"Milan, Italie, 25 mai au 1er juin 2013

16. Guiso N. EU-Pertgenomics/EUPERTstrain conference–Modérateur-Varsovie-Pologne du 5 au 7 juin 2013

17. Guillot S., Bouchez B., Guiso N. – EU-Pertgenomics/EUPERTstrain conference « Novelties from *Bordetella* holmesii isolates collected in France » Varsovie-Pologne du 5 au 7 juin 2013

18. Hegerle N., Guiso N. - EU-Pertgenomics/EUPERTstrain conference "Evolution of *Bordetella* pertussis population: What can be learnt after a decade of acellular pertussis vaccination in France?" Varsovie-Pologne du 5 au 7 juin 2013

19. Guiso N. -10th International Symposium on *Bordetella*- "Human *Bordetella* planet : latest updates" : Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013

20. Hegerle N., Guiso N. -10th International Symposium on *Bordetella*- "In-vitro inhibition of *Bordetella pertussis* induced macrophage apoptosis" : Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013

21. Wirsing von König C.H., Guiso N., Riffelmann M. -10th International Symposium on *Bordetella*- « Biological diagnosis of *Bordetella* infections" Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013

22. Strati F., Guillot S., Guiso N., Bouchez V. -10th International Symposium on *Bordetella*- "Temporal analysis of the expression of ptxA by *Bordetella pertussis* isolates belonging to different vaccine era", Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013

23. Guillot S., Guiso N. -10th International Symposium on *Bordetella*- "External quality controls of real-time PCR *Bordetella* diagnosis held in 2010 and 2012 in laboratories involved in Bordetellosis surveillance in France" Dublin, Irlande, du 8 au 11 septembre 2013

24. Guillot S., Brun D., Doré G., Njamkepo E., Le Coustumier A. and Guiso N. -10th International Symposium on *Bordetella*- « Evolution of *Bordetella bronchiseptica* in its host ». Dublin, Irlande du 8 au 11 septembre 2013

25. Guiso N. Symposium pour l'anniversaire des 150 ans de la naissance du Professeur Jean Cantacuzène, fondateur de l'Institut Cantacuzène, « Maladies à prévention vaccinale » Roumanie, Bucarest du 20 au 22 novembre 2013

2014

26. Guiso N. Conférence « Why is *Bordetella* pertussis still circulating? ». Lisbonne-Portugal 30-01 au 03-02-2014

27. Guiso N. Congrès – « Current pertussis epidemiology and strategies for prevention and surveillance » Moscou, Russie, 14 au 16-02-2014.

2016

28. Guiso N. 11th International *Bordetella* Symposium « Methods for surveillance of Pertussis » Buenos Aires, Argentine, 5 au 8-04-2016.

29. Bouchez V. 11th International *Bordetella* Symposium New data on Vaccine Antigen Deficeincy in *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* » Buenos Aires, Argentine, 5 au 8-04-2016.

2017

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

2018

31. Brisse S. : Présentation orale à la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée à Copenhague, le 13 septembre 2018 : « Understanding whooping cough resurgence by a population genomics approach »

2019

32. Bouchez V. : Présentations orale à la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée à Rome, le 07 et 08 Octobre 2019 : « Understanding whooping cough resurgence in Europe using a population genomic approach »

33. Bouchez V. : Présentation orale à la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée à Rome, le 07 et 08 Octobre 2019 : « Quantification of bacterial antigens production by Bordetella pertussis clinical isolates using an absolute proteomic quantification method »

2020

34. Brisse S.: 17 Sept 2020: Keynote lecture: How ecology, vaccines and antibiotics are driving the evolution of bacterial pathogens (Symposium for the Retirement of Marc Struelens, Chief Microbiologist at ECDC.

35. Toubiana J. : présentation orale à la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée en visioconférence, depuis Paris (organisée par l'unité BEBP), le 24 septembre 2020 : « Impact of recent vaccine schedule changes on pertussis epidemiology in France"

36. Bouchez V.. : présentation orale à la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée en visioconférence, depuis Paris (organisée par l'unité BEBP), le 24 septembre 2020 : « Evolution of Bordetella pertussis in France over a 23-year period"

37. Guillot S. : présentation orale à la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée en visioconférence, depuis Paris (organisée par l'unité BEBP), le 24 septembre 2020 : « Low detection rate of Bordetella pertussis using the BioFire FilmArray Respiratory Panel 2plus"

2021

38. Bouchez V. : présentation orale lors de la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée en visioconférence le 23 Septembre 2021 « *Bystander vaccine-escape evolution of Bordetella parapertussis »*

39. Bridel S. : présentation orale lors de la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée en visioconférence le 23 Septembre 2021, « *A unified genomic library for the Bordetella genus »*

40. Lefrancq N. : présentation orale lors de la réunion EuPertStrain qui s'est déroulée en visioconférence le 23 Septembre 2021 : « *Estimating global spatial dynamics and vaccine induced fitness changes of Bordetella pertussis* »

4.5 ENSEIGNEMENTS DE 2011 A 2021

2011

Nicole GUISO

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses"
Institut Pasteur – le 8 février 2011 (3 heures).

Dans le cadre du cours International Francophone de Vaccinologie : présentation "La vaccination coquelucheuse : conséquences de cinquante années vaccination "
Ecole du Val de Grâce - le 30 mars 2011 (1h15).

Dans le cadre du cours Pasteur-CNAM School of Public Health, Cours de Vaccinologie : "Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the example of *Pertussis* and Diphtheria"

Institut Pasteur - le 29 mars 2011 (1h30).

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2010 : présentation " Le genre *Bordetella* : composition et évolution en fonction de la vaccination"
Institut Pasteur - le 06 septembre 2011 (1h30).

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud sur "Vaccin anti-coquelucheux" – Présentation "Nouveautés du côté de B. pertussis et des vaccins coquelucheux"
Chatenay Malabry - octobre 2011 (3 heures)

2012

Nicole Guiso

Dans le cadre du cours AgroParisTech 2012 : présentation "Vaccination coquelucheuse et épidémiologie de la maladie"Paris - le 24 février 2012 (1h30)

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses"
Institut Pasteur - le 8 février 2012 (3 heures)

Dans le cadre du cours Pasteur-CNAM School of Public Health, Cours de Vaccinologie : "Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease : the example of *Pertussis* and Diphtheria" Institut Pasteur - le 27 mars 2012 (1h30)

Dans le cadre du cours International Francophone de Vaccinologie : présentation "La vaccination coquelucheuse : conséquences de cinquante années vaccination " Ecole du Val de Grâce - le 28 mars 2012 (1h15)

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2012 : présentation " Le genre *Bordetella* : composition et évolution depuis l'introduction de la vaccination coquelucheuse" Institut Pasteur - le 11 septembre 2012 (1h30)

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud – Présentation "B. pertussis et les vaccins coquelucheux». Chatenay Malabry - le 16 octobre 2012 (3 heures)

2013

Nicole Guiso

Dans le cadre du cours Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque 2012-2013 : « Evolution de l'épidémiologie des maladies infectieuses en fonction de la vaccination : exemples de la coqueluche et de la diphtérie »
Paris – le 13 février 2013 (3h)

Dans le cadre du cours AgroParisTech 2013 : « Introduction à l'immunologie sur le thème de la vaccination » Paris – le 5 mars 2013 (1h30)

Dans le cadre du cours Vaccinology, 2013: « Of the importance of following epidemiology upon vaccination: the example of *Pertussis* and Diphteria vaccines »
Paris – le 26 mars 2013 (1h30)

Dans le cadre du cours de Bactériologie Médicale 2013 : « Le genre *Bordetella* » Paris-23 avril 2013 (3h30)

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2013 : « Le genre *Bordetella* : évolution depuis l'introduction de la vaccination coquelucheuse » Paris – le 18 septembre 2013 (1h30)

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-Sud à Chatenay Malabry : "B. pertussis et les vaccins coquelucheux" - le 22 octobre 2013 (3 heures).

2014

Nicole Guiso

Dans le cadre de l'Institut Pasteur, Cours sur la Circulation des Agents Infectieux et Maitrise des Risques : « Evolution de l'épidémiologie des maladies infectieuses en fonction de la vaccination : exemples avec la coqueluche et la diphtérie » – le 11 février 2014 (2h30)

Dans le cadre du cours AgroParisTech 2014 : « Vaccination coquelucheuse et épidémiologie de la maladie » Paris -- le 5 mars 2014 (1h30)

Dans le cadre du Cours International Francophone de Vaccinologie, 2014 : « La vaccination coquelucheuse : conséquences de soixante années de vaccination » Paris -- le 12 mars 2014 (2h00)

Dans le cadre du cours anglophone de Vaccinology: "Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the examples of Diphtheria and Whooping cough" Paris – le 26 mars 2014 (1h30)

Dans le cadre de l'Institut Pasteur, Cours de bactériologie Médicale : « Le Genre *Bordetella* : évolution depuis l'introduction de la vaccination coquelucheuse » - le 25 Septembre 2014

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-Sud à la faculté de Chatenay Malabry : "*B. pertussis* et les vaccins coquelucheux" - le 21 octobre 2014 (3 heures).

2015

Nicole Guiso

Dans le cadre de l'Institut Pasteur, Cours sur la Circulation des Agents Infectieux et Maitrise des Risques : « Evolution de l'épidémiologie des maladies infectieuses en fonction de la vaccination : exemples avec la coqueluche et la diphtérie » en février 2015 (2h30)

Dans le cadre du cours AgroParisTech 2015 : « Vaccination coquelucheuse et ses conséquences sur l'épidémiologie de la maladie » Paris, en Mars 2015 (1h30)

Dans le cadre du cours anglophone de Vaccinology: "Impact of vaccination on epidemiology of infectious disease: the examples of Diphtheria and Whooping cough" Paris – mars 2015 (1h30)

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-Sud à la faculté de Chatenay Malabry : "*B. pertussis* et les vaccins coquelucheux" - le 18 novembre 2015 (3 heures).

2017

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud sur "Vaccin anticoquelucheux" – Présentation "Nouveautés du côté de B. pertussis et des vaccins coquelucheux" - Chatenay Malabry - octobre 2017 (3 heures)

2018

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud – Présentation "*B. pertussis* et les vaccins coquelucheux ». Chatenay Malabry - le 16 octobre 2018 (3 heures)

2019

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-Sud à Chatenay Malabry : "*B. pertussis* et les vaccins coquelucheux" - le 22 octobre 2019 (3 heures)

2020

Julie Toubiana

Cours DIU de pathologie infectieuse pédiatrique « la coqueluche »

Julie Toubiana

Cours aux étudiants de médecine Université Paris Cité – « la coqueluche »

2021

Julie Toubiana

Cours DIU de pathologie infectieuse pédiatrique « la coqueluche »

Julie Toubiana

Cours aux étudiants de médecine Université Paris Cité – « la coqueluche »

2017 - 2021

Sylvain Brisse réalise des enseignements chaque année sur la Biologie des populations de *B. pertussis* et ses applications en santé publique ; ces cours sont données dans des Masters : Cours de Microbiologie de l'Institut Pasteur (U Paris / Sorbonne U) ; Master de Diagnostic de Université Paris Cité ; ...

4.6 EXPERTISES

Julie Toubiana a participé au Groupe de travail Haut Comité de Santé Publique (HCSP) « Recommandations de la vaccination de la coqueluche chez la femme enceinte », publié le 12 avril 2022 : https://www.has-sante.fr/jcms/p_3331263/fr/coqueluche-vacciner-la-femme-enceinte-pour-proteger-le-nouveau-ne.

5. DESCRIPTION DES PROCESSUS QUALITE ET GARANTIES MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU LABORATOIRE

5.1 DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE

Le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses et plus généralement, l'Unité de recherche Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes (BEBP) qui l'héberge, ont mis en place depuis plusieurs années une démarche d'assurance qualité basée d'une part sur un système documentaire qui décrit l'organisation de l'unité, les modes opératoires techniques et l'enregistrement des données et d'autre part sur un système de management de la qualité qui l'engage dans une démarche d'amélioration continue de la qualité.
La réforme de la biologie médicale de 2010 prévoit l'accréditation des CNR par le COFRAC selon la norme ISO 15189. Les CNR hébergés à l'Institut Pasteur sont regroupés dans une structure nommée LREMS (Laboratoires de Référence et d'Expertise Multi-Sites) où chaque CNR est un site. Le LREMS a défini une politique qualité et dispose d'un service qualité qui comprend 2 ingénieures qualité qui ont pour mission d'aider les CNR dans leur démarche qualité, d'organiser les audits internes, d'harmoniser le système qualité des CNR au sein du LREMS et de veiller à la mise en conformité des documents et processus selon la norme EN ISO 15189. La démarche qualité est décrite de façon plus détaillée dans l'annexe 2 « Processus qualité ».

Au sein du LREMS, le CNR a obtenu l'accréditation ISO 15189 en novembre 2013 pour les techniques de diagnostic moléculaire de la coqueluche par PCR en temps réel. Depuis lors, le CNR poursuit sa démarche d'amélioration continue de la qualité.

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 IS*481 ;*
- Recherche et identification moléculaire : bactéries du genre *Bordetella* dont le génome contient une ou plusieurs copies de la séquence d'insertion IS*1001.*

L'accréditation du CNR a été renouvelée en 2021. L'attestation est consultable sur le site du COFRAC (https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf).

5.2 RECONNAISSANCE DU LABORATOIRE PAR DES INSTANCES NATIONALES OU INTERNATIONALES

Le CNR participe annuellement à un contrôle externe de la qualité (CEQ) pour l'identification des espèces de *Bordetella* responsables de la coqueluche ou d'un syndrome coqueluchoïde.

5.3 GESTION DE LA CONFIDENTIALITE

Au sein de l'Institut Pasteur, tout est mis en œuvre pour garantir aux patients la stricte confidentialité des données les concernant. Le personnel est, par son contrat de travail, soumis à la confidentialité. L'accès à l'Institut Pasteur et aux laboratoires est réglementé selon les dispositions internes du pôle Sûreté. Concernant les interventions par les sociétés extérieures, une clause de confidentialité est cadrée avec le service juridique dans les contrats d'intervention. La gestion de la confidentialité est décrite de manière plus détaillée dans l'annexe 3 « Organisation des CNR à l'Institut Pasteur ».

Au CNR, la confidentialité des données est garantie par :

- Un accès limité par badge aux locaux ;
- Dossiers patients gardés dans un bureau fermé à clef ;
- La restriction d'accès à la base de données aux seules personnes habilitées par le CNR : utilisation de logins et de mots de passe ;
- La validation des numéros de fax avant envoi d'un compte rendu de résultats à un laboratoire.

6. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

6.1 CAPACITE A METTRE EN ŒUVRE LA TRANSMISSION REGULIERE ET AUTOMATISEE DE DONNEES VERS SANTE PUBLIQUE FRANCE

Le logiciel Lagon est utilisé pour la saisie et le stockage des données sur les échantillons du CNR. Cette application informatique (base de données, interface utilisateur, architecture…) est décrite dans le chapitre « Infrastructure informatique » du document sur l'organisation des CNR à l'Institut Pasteur fourni en Annexe de ce dossier.

L'application Lagon permet également l'extraction de données agrégées ou de fichiers plats anonymisés (feuilles Excel, fichier texte, pdf...) pour envoi à Santé Publique France. Le niveau de sécurisation des transferts dépend de la nature des données (individuelles ou agrégées).

Les points qui concernent spécifiquement le CNR Coqueluche et autres bordetelloses sont décrits ci-dessous.

La saisie des données concernant les prélèvements et isolats envoyés pour expertise au CNR se fait sur Lagon v2.18. Cette application informatique nous permet également la saisie des résultats d'analyse et leur validation. Les rapports d'analyses sont générés par extraction automatique des données pour envoi des résultats aux clients.

Les données du réseau RENACOQ sont envoyées annuellement à Santé Publique France à partir des données extraites de l'application Lagon.

6.2 PROCEDURES VISANT AU RESPECT DE LA CONFORMITE A LA REGLEMENTATION RELATIVE AU TRAITEMENT AUTOMATISE DES DONNEES A CARACTERES PERSONNEL OU LES EVOLUTIONS PREVUES

La conformité à la réglementation sur ces aspects est décrite dans le chapitre « traitement des données à caractère personnel » de l'Annexe « Organisation des CNR à l'Institut Pasteur ». En particulier, les autorisations CCTIRS et CNIL ont été obtenues. La déclaration a été faite à la CNIL en décembre 2010.

7. PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2023-2027

Le programme de travail proposé pour le mandat 2023-2027 est dans la continuité du programme réalisé en 2017-2021 (décrit dans ce document) et en 2022. Nous maintiendrons et développerons nos réseaux de partenaires, poursuivrons notre programme de développement de méthodes d'analyses, maintiendrons nos activités d'expertise et de surveillance en les développant en particulier dans le domaine de la culture des souches et de leur caractérisation par métagénomique à partir des échantillons, et assurerons nos missions de conseil et d'alerte.

7.1 ACTIVITES D'EXPERTISE

7.1.1 Réseaux de partenaires

Les réseaux des biologistes et cliniciens **RENACOQ** (coordonné par SpF, et par le CNR pour le versant microbiologique) et **CBVH** resteront nos partenaires privilégiés pour la surveillance des souches de *B. pertussis* en France. Un programme de renforcement des capacités de culture et de développement de la métagénomique clinique sera mis en œuvre. Une enquête sur les intentions de maintien de la culture dans les labos a été réalisée en 2022, pour analyser les barrières à ce maintien, et les solutions potentielles pouvant être apportées par le CNR ; une réunion de synthèse avec nos partenaires est planifiée. Ce projet sera poursuivi durant la mandature.

Nous continuerons à participer activement au réseau européen de laboratoires de référence **EuPertStrain,** afin d'échanger des protocoles et de disséminer nos méthodes analytiques, réaliser des EQA, et de façon plus générale, partager nos expertises. Dans le cadre de ce réseau, le projet European Reference Laboratory Network for Pertussis (ERLNPert-Net ; 2019-2022) se poursuit avec en particulier des EQA pour tester nos méthodes de détection de perte de pertactine, sérotypes, et résistance aux macrolides.

L'intégration internationale des données génomiques implique un grand nombre de collaborations potentielles. Par exemple nous travaillerons avec nos collègues américains (CDC, Atlanta) et Espagnols (Barcelona) sur l'évolution des populations de *B. parapertussis* face aux vaccins, sujet peu documenté par rapport à la situation chez *B. pertussis*.

Nous poursuivrons nos collaborations avec le Centre d'Infection et Immunité de Lille (Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Dir. **Camille Locht**), à l'Institut Pasteur de Lille. Le groupe de C. Locht mène en effet des recherches fondamentales sur la virulence de *B. pertussis* et la régulation de l'expression des gènes, ainsi que sur le développement d'un vaccin vivant atténué et la réponse vaccinale. Notre complémentarité évidente permettra de renforcer l'expertise du CNR sur pertussis et permettra à l'équipe de C. Locht d'optimiser ses projets de recherche en regard de la biodiversité des souches circulant en France.

Nous poursuivrons nos collaborations avec des laboratoires de microbiologie vétérinaire (par exemple réseau Résapath, **J.-Y. Madec**) pour améliorer les connaissances des souches d'infections ou de portage chez l'animal (par exemple, *B. bronchiseptica*) et échanger avec ce versant encore trop cloisonné de la médecine humaine. Cet objectif s'inscrit dans les projets de l'unité d'analyser la diversité et l'écologie des isolats de *Bordetella*, au-delà des pathogènes classiques de l'homme.

Nous poursuivrons nos collaborations avec les immunologistes du **labex Milieu Interieur et la plateforme d'immunologie clinique de l'Institut Pasteur**, pour l'étude de la réponse immunitaire systémique in vitro aux différentes souches circulantes.

Par ailleurs, nous avons développé de nouvelles collaborations cliniques, afin d'appliquer ces technologies pour l'étude de la réponse immunitaire à l'échelle du patient : le CNR fait partie du **FHU CHILD** (responsable Pr Chalumeau) et est en lien avec un réseau de réanimateurs pédiatres français via une collaboration déjà en place avec le **CIC de Nantes** (projet DIACOQ, ancillaire de l'étude PREPS DIABACT dont le coordinateur est le Pr Gras Leguen, CIC de Nantes).

Enfin, Julie Toubiana est partie se former **au laboratoire d'immunologie vaccinale du Prof. Robert Malley, Harvard**, afin de développer une nouvelle collaboration pour importer une approche innovante d'analyse transcriptomique bactérienne « in situ » au cours de l'infection par *B. pertussis*.

7.1.2 Techniques de détection, d'identification et de caractérisation en développement ou dont le développement est prévu

Cette partie a été supprimée du rapport public

7.1.3 Mode de constitution, de stockage et de mise à disposition des collections

Les nouveaux isolats seront mis en collection, stockés et mis à disposition comme décrit en section 2 et dans l'annexe commune aux CNR de l'Institut Pasteur.

7.1.4 Évaluation de techniques

Évaluation du séquençage génomique (WGS, pour whole genome sequencing).
Le CNR participera aux évaluations de méthodes d'analyse pour la détection de la résistance aux macrolides, en cours via le réseau EuPertStrain. Désormais réalisé au CNR à partir des données WGS, la validation de l'approche développée permettra de surveiller la possible

émergence de ce phénomène redouté, la résistance aux macrolides étant très prévalente en Chine, ce qui fait craindre une possible dissémination.

Évaluation du MALDI-TOF

Nous poursuivrons nos évaluations de la méthode MALDI-TOF (Bruker) pour l'identification et discrimination des espèces de *Bordetella* (voir section précédente).

7.1.5 Projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires

Nous continuerons à aider nos correspondants (hospitaliers principalement) à maintenir ou mettre en place la culture dans leur laboratoire. Ce sera le défi des prochaines années que cette technique qui disparaît au bénéfice de la PCR soit maintenue au sein des laboratoires hospitaliers.

Nous poursuivrons également nos actions de formation pratique en recevant des visiteurs d'autres laboratoires (par exemple Européens dans le cadre du projet LabNet, devenu le projet ERLNPert-Net sur 2019-2022) pour transférer nos techniques vers d'autres laboratoires.

7.1.6 Travaux de recherche appliqués envisagés en lien avec les missions du CNR

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

Comprendre les liens entre la perte d'expression des antigènes et l'efficacité vaccinale est un thème central de recherche appliquée à la santé publique chez *B. pertussis*. Ces recherches apportent des informations nécessaires aux politiques vaccinales et pour les stratégies de développement de nouveaux vaccins. Nous avons montré que sur 23 années de surveillance microbiologique en France, les souches n'exprimant par FHA ou PT sont très rares et il n'y a aucune évidence de transmission de ces variants, qui sont à considérer anecdotiques (Bouchez *et al*., EuroSurveillance, 2021). En revanche, les isolats n'exprimant pas la pertactine (PRN-) représentent environ 50% des isolats collectés récemment en France.

Nous continuerons donc à nous intéresser tout particulièrement à la dynamique évolutive des isolats qui ne produisent pas la pertactine (PRN-). Un objectif important sera de suivre et comprendre l'émergence de ces isolats, qui en France augmentent moins vite en fréquence que dans d'autres pays utilisant des vaccins acellulaires, comme les USA et l'Australie (Lefrancq, Bouchez et al., 2022).

Études taxonomiques des bordetelles

Nous avons récemment montré qu'il existe au moins 20 espèces 'cachées' de Bordetelles, c'est à dire des espèces repérées par comparaisons génomiques (genomic species) mais non encore décrites dans la taxonomie officielle des prokaryotes. En effet, seules 16 espèces de *Bordetella* ont actuellement un statut défini sur la taxonomie Procaryote, parmi les 36 espèces génomiques détectées (voir **Figure 1** ; Bridel, Bouchez *et al.*, 2022 BioRxiv).

Nous nous intéresserons à celles que l'on trouve en clinique humaine et représentées dans la collection du CNR. Nous utiliserons une approche multidisciplinaire basée sur la caractérisation phénotypique, biochimique, protéomique (à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF) et génomique. Des descriptions taxonomiques de ces nouvelles espèces pourront être menées.

Ce travail de mises à jour taxonomiques aura des conséquences directeres sur le diagnostic et sera lié à notre projet de développement de spectres de référence MALDI-TOF (voir partie développements de méthodes).

Évolution de B. parapertussis face à la vaccination

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

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

Nous poursuivrons aussi le travail commencé sur la comparaison des souches de *B. pertussis* produisant FIM2 ou FIM3, deux antigènes vaccinaux distincts sérologiquement. Ce projet est réalisé dans le cadre de la thèse de doctorant de Soraya Matczak (Dir : Julie Toubiana) et a pour objectif de comprendre la dynamique épidémiologique de ces deux sérotypes et leur impact biologique ou clinique. Notre approche combinera comparaisons génomiques, microbiologiques (adhésion, aggrégation, biofilms), protéomiques (PRM, DIA) et immunologiques (réponse cytokinique, transcriptomique suite à stimulation).

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

L'évolution récente des populations de *B. pertussis* au cours de l'ère vaccinale associée à des modifications d'expression de gènes de facteurs de virulence, contribue à l'échappement vaccinal favorisant le portage asymptomatique et la circulation persistante de la bactérie. Ces modifications de profil d'expression chez B*. pertussis* pourraient être associées à des phénotypes cliniques de gravité variable chez l'enfant, et le phénotype clinique de la coqueluche chez le nourrisson pourrait également être impacté par la variabilité de la réponse muqueuse et systémique de l'enfant vis-à-vis de *B. pertussis*.

A travers une approche translationnelle, nous avons le projet de caractériser les profils d'expression des gènes/protéines des souches *de B. pertussis* actuellement en circulation, identifier les gènes de *B. pertussis* exprimés lors d'une coqueluche sévère et déterminer l'implication des réponses immunitaires systémiques sur la gravité de la maladie. Notre approche sera globale car elle repose sur l'utilisation combinée de la collection d'isolats de

B. pertussis hébergée par le CNR et d'une cohorte clinique de coqueluches pédiatriques. Notre ambition est d'identifier de nouvelles cibles vaccinales et de décrire de nouvelles voies immunitaires et signatures de la gravité de la maladie.
- Nous réaliserons une analyse protéomique et transcriptomique différentielle d'isolats issus d'un large panel de formes cliniques.
- Nous développerons la technologie d'analyse transcriptomique « in situ » de *B. pertussis* via la technologie NanoString nCounter et analyserons le profil microbien « in situ » et la réponse immunitaire chez des nourrissons atteints de coqueluche

Des études récentes ont soulevé la difficulté de généraliser les résultats obtenus de cultures in vitro de *B. pertussis* à ce qu'il se passe réellement au cours d'une infection chez l'enfant. Cette approche challengera les techniques « in vitro » largement utilisées pour les études d'expression génique microbienne. La méthode que nous allons utiliser permet de quantifier les transcrits d'ARNm directement sur des prélèvements cliniques sans passer par les étapes d'isolement bactérien et d'amplification.

7.2 ACTIVITE DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION

Nous continuerons d'apporter à nos clients (terminologie ISO 15189) et correspondants, nos conseils pour l'aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel, ce qui inclut l'envoi des recommandations sur la conduite à tenir aux professionnels de la santé. L'arrivée de Julie Toubiana, pédiatre infectiologue, a permis d'apporter une expertise clinique pour répondre aux questions de nos correspondant sur la vaccination et les méthodes de prévention, le diagnostic et les traitements.

Le CNR prendra également part aux réunions ad-hoc qui regroupent la DGS, Santé Publique France et les ARS et apportera son expertise aux discussions sur les diagnostics biologiques et l'efficacité des vaccins. Le CNR contribuera ainsi à l'évaluation du programme de vaccination.

Nous poursuivrons nos missions d'enseignements, de formation et d'accueil de stagiaires ou de professionnels désireux de renforcer leurs capacités en microbiologie des bordetelles.

Les informations concernant le CNR sont disponibles pour les professionnels de santé et le grand public via notre site web : http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses, et seront régulièrement mises à jour.

Les questions les plus fréquentes de nos correspondants et les liens utiles seront mis à jour.

Le CNR continuera à publier sur son site web, les résultats de ses évaluations des trousses de diagnostic biologique de la coqueluche disponibles commercialement.

7.3 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

7.3.1 Constitution, développement et animation de réseaux

Le CNR repose sur plusieurs réseaux collaboratifs dans lesquels nous continuerons à nous investir.

Notre CNR va poursuivre son implication forte dans le réseau hospitalier pédiatrique **RENACOQ**. Ce réseau créé en 1996 et coordonné par Santé Publique France, comprend 42 hôpitaux répartis dans toute la France. Nous continuerons à animer le volet biologique du réseau, et d'apporter nos conseils et 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* dans les laboratoires hospitaliers. Suite à un questionnaire dédié à la culture récemment envoyé à nos partenaires, nous avons identifié des actions qui seront mises en place prochainement pour aider à poursuivre la mise en culture.

Le CNR continuera à entretenir et renforcera ses liens avec le réseau de microbiologistes du **CBVH** (collège de Bactériologie, Virologie, Hygiène) des hôpitaux français). Ce réseau est très complémentaire au réseau RENACOQ, car il fournit en particulier de nombreuses souches issues d'autres infections que la coqueluche. Une grande partie des souches isolées et envoyées au CNR représentent d'autres espèces que *B. pertussis* et *B. parapertussis*, contribuant à la surveillance des bordetelloses autres que la coqueluche.

L'unité de recherche continuera à participer au réseau **ACTIV** (Association Clinique et Thérapeutique Infantile du Val de Marne), réseau de 55 pédiatres en ambulatoire par lequel des cas de coqueluche sont détectés.

Nous envisageons par ailleurs de continuer à développer des réseaux avec les médecins de ville (collaboration avec le réseau **Sentinelles** incluant pédiatres et médecins généralistes).

Le CNR continuera à participer à la surveillance des cas et surveillera les éventuelles modifications épidémiologiques liées aux changements de stratégie vaccinale, comme celle récente concernant la vaccination des femmes enceintes.

7.3.2 Les modalités de surveillance de la résistance aux anti-infectieux

Nous continuerons à surveiller l'apparition d'isolats de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* qui ne seraient plus sensibles aux macrolides. L'antibiogramme est réalisé systématiquement sur les souches analysées au CNR. L'analyse génomique des souches permettra aussi de caractériser d'éventuels gènes impliqués dans la résistance.

7.3.3 Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels

Nous poursuivrons notre contribution aux alertes le cas échéant. L'occurrence de cas groupés est fort heureusement rare dans le cas de la coqueluche et des autres bordetelloses (voir section 3). Toutefois, il est à craindre suite à la période COVID19 et les mesures barrières, qui ont été suivies d'une baisse radicale des cas de coqueluche, que la population sensible est soit en augmentation et cela pourrait se traduire par une résurgence prochaine.

7.3.4 Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux

Nous poursuivrons notre participation dans le cadre du réseau **EuPertStrain**, au projet **ERLNPert-Net** (ex-**LabNet)**, visant à coordonner un réseau de laboratoires de surveillance de la coqueluche et à intégrer les activités de surveillance microbiologique avec la surveillance épidémiologique. Le projet **ERLNPert-Net** est financé par le ECDC. Dans ce cadre, nous participerons à des EQA et formerons des personnels de différents pays au diagnostic de la coqueluche. Par ailleurs, nous discuterons de nos développements en typage et épidémiologie génomique et de la diffusion dans ce réseau des méthodes standard que nous mettrons au point.

7.3.5 Les projets d'enquêtes ou d'études concourant à la surveillance

Nous continuerons à interagir avec le LBM CERBA concernant l'évolution de l'utilisation des diagnostics biologiques en France.

Nous poursuivrons le renforcement de RENACOQ et des liens avec les labos CBVH.

7.4 CONTRIBUTION A L'ALERTE

Lors du signalement ou de la détection de cas groupés de coqueluche, le CNR s'assurera que l'agence Santé Publique France est prévenue immédiatement.

Le CNR enverra par courriel à ses correspondants, les recommandations de la DGS, le calendrier vaccinal, et l'avis du HCSP. Le CNR conseillera sur les diagnostics biologiques à utiliser, par téléphone et par mail.

Lorsque les ARS ou Santé publique France le solliciteront lors de cas groupés, le CNR réalisera des PCR de contrôle pour confirmer ou infirmer la nature de l'infection par une bordetelle.

ANNEXE 1

Composition des vaccins coquelucheux acellulaires disponibles en France

Vaccin à	Primo vaccination	Rappel		
2 composants	Hexyon®	Tetratavac®	Pentavac®	
PT	25 µg	25 µg	25 µg	
FHA	25 µg	25 µg	25 µg	
Autorisation de mise sur le marché (AMM)	*2013*	*1998*	*1998*	
3 composants	InfanrixHexa®	BoostrixTetra®	InfanrixTetra®	InfanrixQuinta®
PT	25 µg	8 µg	25 µg	25 µg
FHA	25 µg	8 µg	25 µg	25 µg
PRN	8 µg	2.5 µg	8 µg	8 µg
AMM	*2000*	*2005*	*1996*	*1997*
5 composants	Vaxelis®	Repevax®		
PT	20 µg	2.5 µg		
FHA	20 µg	5 µg		
PRN	3 µg	3 µg		
FIM2+FIM3	5 µg	5 µg		
AMM	*2016*	*2002*		

Source : Bouchez et al., 2021 EuroSurveillance 26:2001213 (https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.37.2001213)

ANNEXE 2

Processus Qualité

Contexte général

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

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

Un manuel Qualité permet de présenter le contexte et les moyens mis en œuvre pour le fonctionnement du LREMS. Une procédure d'organisation dans chaque CNR complète ce manuel en précisant notre fonctionnement propre.

La politique qualité LREMS est rédigée et signée par la DRTE et la Direction Médicale. Cette politique est complétée par une lettre d'engagement signée par chacun des responsables :

La suite de cette partie a été supprimée du rapport public

ANNEXE 3

ORGANISATION DES CNR A

L'INSTITUT PASTEUR

Cette partie a été supprimée du rapport public