

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

**Soutenu publiquement le mardi 15 juin 2021
par M. Camille Cordier**

conformément aux dispositions réglementaires en vigueur
tient lieu de

THÈSE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Intérêts et limites de la culture de *Bordetella
pertussis* à l'ère du diagnostic moléculaire.
Diversité des isolats cliniques en Hauts-de-France
entre novembre 2017 et mars 2019.**

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH, Institut de Biochimie, Centre de Biologie et Pathologie, CHU de Lille

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Olivier GAILLOT, MCU-PH, Service de Bactériologie-Hygiène, Centre de Biologie et Pathologie, CHU de Lille

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Camille LOCHT, Professeur - Directeur de recherche Inserm, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille

Monsieur le Professeur Boualem SENDID, PU-PH, Service de Parasitologie-Mycologie, Centre de Biologie et Pathologie, CHU de Lille

Madame le Docteur Anne VACHÉE, PH, Unité fonctionnelle de Bactériologie-Hygiène, Laboratoire de biologie, Centre Hospitalier de Roubaix



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie

Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire

Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique

Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOThIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie

Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Au président de mon jury,

Monsieur le Professeur Thierry Brousseau

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Institut de Biochimie
Centre de Biologie et Pathologie
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse.
Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

À mes juges,

Monsieur le Professeur Camille Loch

Professeur – Directeur de recherche Inserm
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Institut Pasteur de Lille

Monsieur le Professeur Boualem Sendid

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Service de Parasitologie – Mycologie
Centre de Biologie et Pathologie
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Madame le Docteur Anne Vachée

Praticien Hospitalier
Unité fonctionnelle de Bactériologie – Hygiène
Laboratoire de biologie
Centre Hospitalier de Roubaix

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury. Soyez assurés de ma considération.

À mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Olivier Gaillot

Maitre de Conférence Universitaire – Praticien Hospitalier
Service de Bactériologie – Hygiène
Centre de Biologie et Pathologie
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Vous m'avez fait l'honneur de me proposer de réaliser une thèse sous votre direction. Je vous remercie pour votre grande implication dans ce travail, votre soutien indéfectible, votre disponibilité, votre gentillesse et votre humour. Vous avez été le puits de connaissances qui m'a donné le goût de la microbiologie et de la science.

Vous avez été un véritable ami, qui m'a fait découvrir les merveilleux mondes de la cuisine, du cinéma, de la musique, de l'étymologie au cours de nos longues discussions.

Je tiens également à remercier,

Tous les techniciens du laboratoire de bactériologie, et en particulier Sophian Messaadi, Laetitia Lecci et Audrey Charlet.

Tous les techniciens de biologie moléculaire : Laure Marceau, Sylvie Armand, Sébastien Galichet et Céline Manesse.

Je vous remercie pour votre implication dans ce projet sans laquelle il n'aurait pu aboutir.

Marjorie Cornu, Séverine Loridant, Boualem Sendid. Vous m'avez aidé à gravir les premières marches de la recherche scientifique.

Je dédie ce mémoire

À ma famille,

Mes parents,

Ma sœur Émilie, Nicolas, Antoine et Paul,

Sébastien, Lucile,

Vous m'avez toujours soutenu tout au long de mes longues études.

Maman, tu es un modèle de courage et de gentillesse pour moi.

À Éliisa,

Nous avons traversé tant d'océans ensemble.

À mes amis avec lesquels j'ai grandi,

Florent, Gaëlle,

Anne-Sophie,

William,

Xavier,

Thibault,

Vous avez été les piliers de ma jeunesse.

À mes amis des bancs de la faculté de Rouen,

Marie,

Maxime,

Coraline,

Florian,

Hélène,

Ma vision de la vie a changé à vos côtés.

À mes co-internes,

Malo,

Pauline, Olivier, Maximilien, Maxime, Alan,

Safia, Justine, Laetitia,

Quentin, Thibault, Alexandre, Pauline, Claire, Angèle, Augustin,

Avec lesquels j'ai découvert l'amour de mon métier.

Adrien,

Marc,

Vous m'avez fait découvrir le bonheur de la vie lilloise.

À mes camarades du 7^e art,

Clara,

Joséphine,

Merci pour ces moments de grâce.

À ma deuxième famille,

Luc, Frédérique, Alix, Vénitien,

Gabrielle, Louissette,

Camille, Romain,

Romane, Louise,

Chambord, Piccoli, Gribouille, Cannelle,

Vous êtes un modèle d'amour familial.

À mon amour

Romane,

La vie a un goût unique à tes côtés.

Sommaire

Liste des abréviations	21
Index des figures	23
Première partie : <i>Bordetella pertussis</i> et la coqueluche.....	25
Introduction : brève histoire de la coqueluche et de son agent.....	25
La bactérie : <i>Bordetella pertussis</i>.....	27
Classification	27
Évolution et spéciation au sein du genre <i>Bordetella</i>	29
Pouvoir pathogène de <i>B. pertussis</i>	31
L'infection : la coqueluche et ses complications.....	37
Transmission	37
Physiopathologie	38
Pouvoir pathogène naturel : chant du coq et coqueluche	39
Réponse immunitaire	41
Diagnostic biologique de la coqueluche	44
Typage épidémiologique des isolats de <i>B. pertussis</i>	49
Évolution des souches de <i>B. pertussis</i> depuis la vaccination	50
Deuxième partie : travail expérimental	53
Objectifs du travail	53
Matériel et méthodes.....	55
Échantillons biologiques et caractéristiques des patients	55
Détection génétique de <i>B. pertussis</i>	55
Souches bactériennes de référence.....	56
Culture et identification phénotypique	56
Antibiogramme	57
Analyse spectrométrique des isolats.....	57
Spectrométrie de masse-MALDI-ToF.....	57
Spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier.....	58
Analyses statistiques	58
Résultats	59
Caractéristiques des patients positifs en qPCR coqueluche	59
Isolement de <i>B. pertussis</i> en culture	62
Sensibilité aux macrolides et apparentés.....	63
Évaluation de la diversité des isolats par SM-MALDI-ToF	64
Évaluation de la diversité des isolats par IR-TF	66
Discussion et perspectives.....	69
Conclusion	73
Références bibliographiques.....	75

Liste des abréviations

ACT (ou CyaA) : toxine adénylate cyclase
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
aPV : vaccin anticoquelucheux acellulaire (*acellular pertussis vaccine*)
Bvg : système de régulation des gènes de virulence de *B. pertussis*
CHU : centre hospitalier universitaire
CMI : concentration minimale inhibitrice
CNR : centre national de référence
Ct : *cycle threshold* (cycle d'une PCR au cours duquel l'amplicon devient détectable)
DNT : toxine dermonécrotique
FHA : hémagglutinine filamenteuse
Fim : protéine constitutive d'un *fimbria* (*pilus*)
IR-TF : spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier
HCCA : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, matrice de la SM-MALDI-ToF
HCSP : haut conseil de la santé publique
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IS : séquence d'insertion
LPS : lipopolysaccharide
SM : spectrométrie de masse
MALDI-ToF : *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*
MLST : *multilocus locus sequence typing*
Nod1 : *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1* (récepteur de l'immunité innée)
pb : paire de bases (de l'ADN)
PCR : *polymerase chain reaction*
PFGE : électrophorèse en champ pulsé sur gel
PNN : polynucléaires neutrophiles
PRN : pertactine
PTX : toxine pertussique
ptxP : promoteur du gène de la toxine pertussique
RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de digestion de l'ADN
qPCR : PCR avec suivi du développement de la réaction en temps réel

TA : taux d'attaque (nombre de nouveaux cas au sein d'une population exposée au cours d'une courte période)

TCT : cytotoxine trachéale

T6SS : système de sécrétion de type VI

vags : *virulence-activated genes*

vrgs : *virulence-repressed genes*

VRS : virus respiratoire syncytial

wPV : vaccin anticoquelucheux à bactéries entières (*whole-cell pertussis vaccine*)

Index des figures

Figure 1 : Phylogénie simplifiée des <i>Alcaligenaceae</i> selon leur séquence des gènes de l'ARN ribosomique 16S.....	28
Figure 2 : Phylogénèse des neuf principales espèces du genre <i>Bordetella</i> , obtenue par comparaison des séquences de 128 génomes.	29
Figure 3 : Évolution des génomes de <i>Bordetella</i> ayant conduit à l'acquisition de facteurs de virulence au cours de la spéciation.	30
Figure 4 : Lymphocytose d'un patient atteint de coqueluche sévère.	33
Figure 5 : Activités des toxines de <i>Bordetella pertussis</i> lors de l'infection.....	34
Figure 6 : Régulation des gènes de <i>Bordetella pertussis</i> par le système à 2 composants BvgA/S au cours d'un cycle infectieux.....	36
Figure 7 : Arbre décisionnel du diagnostic de la coqueluche en France.	44
Figure 8 : Réalisation d'un prélèvement nasopharyngé avec un écouvillon fin et flexible.....	45
Figure 9 : Aspect colonial de <i>Bordetella pertussis</i> sur milieu de Bordet-Gengou.	46
Figure 10 : Représentation graphique des sensibilités diagnostiques de la culture (vert), de la PCR (bleu), de la sérologie (rouge) et du diagnostic clinique (orange)..	48
Figure 11 : Répartition temporelle des diagnostics positifs de coqueluche par qPCR IS481.....	59
Figure 12 : Charge bactérienne et âge des patients au moment du diagnostic.....	60
Figure 13 : Charge bactérienne estimée des patients dans les 5 foyers de transmission familiale.....	61
Figure 14 : Résultats de culture d'échantillons qPCR ⁺ selon la charge génomique bactérienne.	62
Figure 15 : Origine géographique des isolats de <i>Bordetella pertussis</i>	63
Figure 16 : Sensibilité aux macrolides et lincosamides des isolats de l'étude.....	64
Figure 17 : Dendrogramme évolutif déduit des données de spectrométrie de masse-MALDI-ToF.	65
Figure 18 : Spectre d'absorbance infrarouge bactérien obtenu par spectrométrie IR-TF.....	66
Figure 19 : Diagramme de dispersion des spectres infrarouges des isolats de 7 espèces de <i>Bordetella</i>	67
Figure 20 : Dendrogramme évolutif déduit des données de spectrométrie IR-TF.	68

Première partie : *Bordetella pertussis* et la coqueluche

Introduction : brève histoire de la coqueluche et de son agent

La coqueluche est une infection d'apparition probablement récente, ses premières descriptions connues datant d'il y a environ 500 ans. Ainsi, des épidémies de coqueluche responsables de décès d'enfants et d'adultes sont initialement décrites en Perse à la fin du XV^e siècle (Aslanabadi *et al.*, 2015). En France, une première épidémie est décrite à Paris en 1578 par le médecin Guillaume de Baillou (1538-1616) qui la dénomme *tussis quintana* (toux en quintes). Au XVII^e siècle, en Angleterre, Thomas Willis (1621-1675) la désigne sous le nom de *pertussis* (toux sévère), tandis que Thomas Sydenham (1624-1689) précise la description du syndrome coquelucheux en le dénommant *tussis puerorum convulsia* (toux convulsive des enfants) d'après ses observations cliniques (Guiso, 2006). En 1900, le médecin belge Jules Bordet (1870-1961) identifie pour la première fois l'agent causal en observant les sécrétions respiratoires de sa fille atteinte de la maladie (Cavaillon *et al.*, 2020). En collaboration avec son compatriote Octave Gengou (1875-1957), ils isolent à l'Institut Pasteur de Paris un microorganisme qu'ils dénomment *Bacillus* puis *Haemophilus pertussis* en raison de ses exigences de culture *in vitro* et de la maladie dont il est responsable (Bordet & Gengou, 1906). Il faudra attendre 1952 pour que sa position taxonomique soit précisée et qu'en hommage à son découvreur le bacille de Bordet et Gengou devienne *Bordetella pertussis* (ITIS Report: Bordetella).

La bactérie : *Bordetella pertussis*

Classification

Le genre bactérien *Bordetella* appartient à la famille des *Alcaligenaceae*, dans l'ordre des *Burkholderiales* de la classe bêta de l'embranchement des *Proteobacteria* (Fig. 1). En 2021, le genre *Bordetella* est composé de seize espèces.

Au sein d'une famille de bacilles à Gram négatif principalement environnementaux et mobiles grâce à des flagelles, *B. pertussis* est un petit coccobacille de 0,2 à 0,7 µm de long, immobile et strictement inféodé à son hôte humain. Sa membrane externe est recouverte d'une fine capsule (Hoo *et al.*, 2014). L'homme en est le seul réservoir connu et la transmission est exclusivement interhumaine directe. *B. pertussis* est responsable de l'immense majorité des cas de coqueluche. Parmi les autres espèces, trois peuvent être à l'origine d'infections respiratoires de moindre gravité que celle causée par *B. pertussis* :

- *Bordetella parapertussis*, la plus fréquente, *a priori* non environnementale, et dont il existe au moins un réservoir ovin.

- *Bordetella bronchiseptica*, espèce environnementale aquacole, mais à l'origine d'infections respiratoires vétérinaires notamment chez les chiens et les chats, et l'un des agents de rhinite atrophique dans les élevages porcins (Garbal *et al.*, 2016). Chez l'Homme, elle peut provoquer des bronchopneumopathies chez les patients immunodéprimés et/ou fragilisés (Ducours *et al.*, 2017).

- *Bordetella holmesii*, décrite en 1983, responsable de rares infections invasives bactériémiques (Pittet *et al.*, 2014).

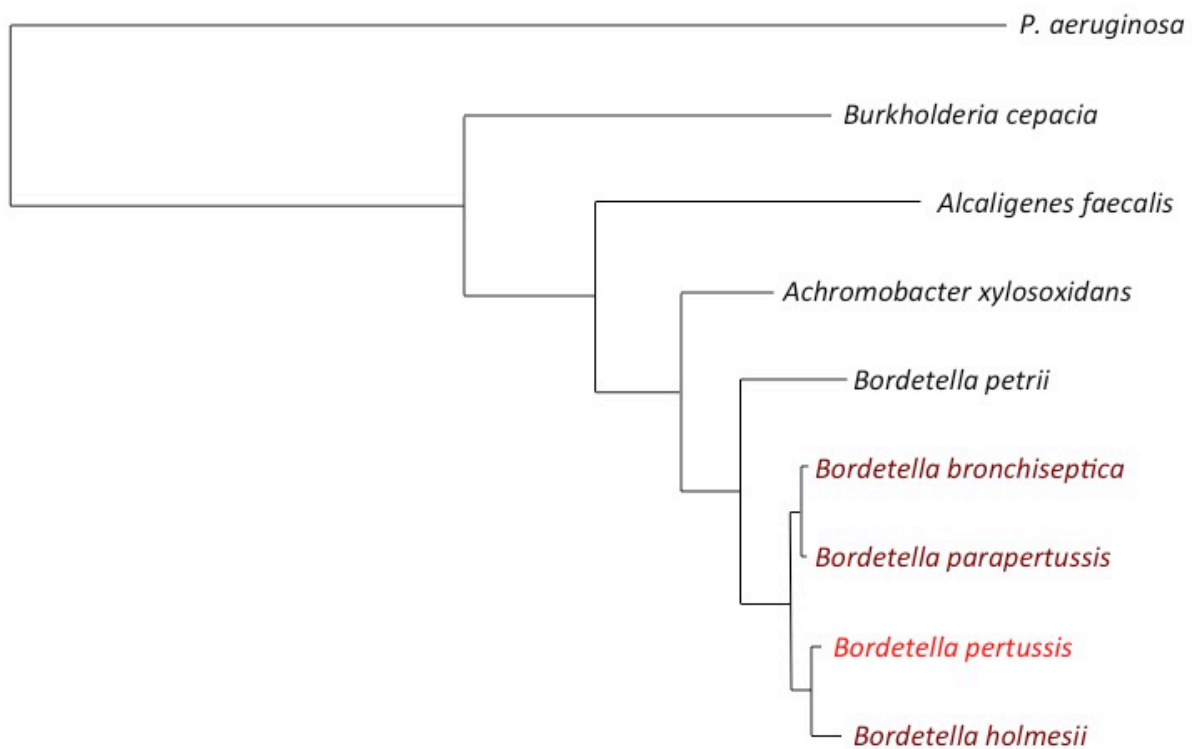


Figure 1 : Phylogénie simplifiée des *Alcaligenaceae* selon leur séquence des gènes de l'ARN ribosomique 16S.

Les *Bordetella* « classiques » susceptibles d'être responsables de syndrome coquelucheux figurent en rouge. Représentant d'un groupe externe pour enraciner l'arbre : *Pseudomonas aeruginosa*.

Hormis ces bordetelles, les autres espèces du genre sont principalement environnementales et ne jouent qu'un rôle mineur en pathologie humaine, provoquant exceptionnellement des infections opportunistes chez l'immunodéprimé et dans les stades tardifs de la mucoviscidose. Une de ces espèces, *Bordetella avium*, partage des caractéristiques pathogéniques communes avec *B. pertussis* et *B. bronchiseptica* par sa capacité à adhérer aux cellules de l'épithélium cilié respiratoire (Loker *et al.*, 2011) lors de l'infection des voies respiratoires supérieures qu'elle provoque chez les dindes d'élevage (Beach *et al.*, 2012).

Évolution et spéciation au sein du genre *Bordetella*

Dans le genre *Bordetella* comme chez toutes les bactéries, de multiples évènements d'acquisition et de disparition de gènes sont à l'origine de la diversification qui permet l'apparition de nouvelles espèces. L'analyse de 128 génomes des 9 espèces les plus courantes du genre a mis en évidence 3 groupes ou clades distincts et les trois espèces à tropisme respiratoire, dites « bordetelles classiques », rencontrées chez l'homme sont regroupées dans le clade A (Linz *et al.*, 2016) (Fig. 2). Des travaux de génomique sur ces 3 espèces semblent montrer que *B. pertussis* et *B. parapertussis* ont évolué respectivement à partir de lignées indépendantes de l'espèce *B. bronchiseptica*, *B. bronchiseptica* et *B. parapertussis* étant plus proches en terme d'organisation globale que *B. bronchiseptica* ne l'est de *B. pertussis* (Diavatopoulos *et al.*, 2005a).

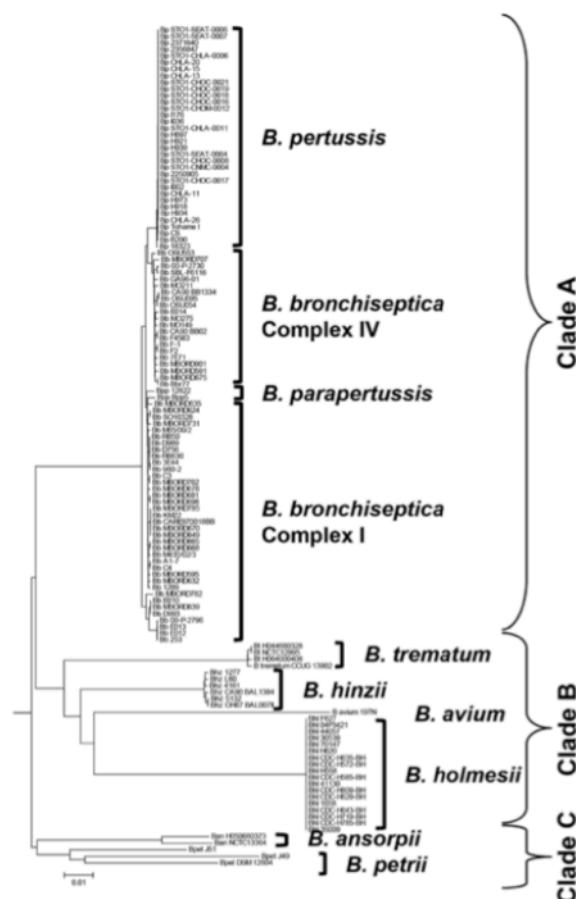


Figure 2 : Phylogénèse des neuf principales espèces du genre *Bordetella*, obtenue par comparaison des séquences de 128 génomes.

Adapté de Linz *et al.*, BMC Genomics, 2016.

L'adaptation de *B. pertussis* à l'Homme à partir d'une espèce plus environnementale est associée à une forte réduction de la diversité génétique, secondaire à la perte ou à l'inactivation de centaines de gènes par mutations ou par de multiples intégrations

de séquence d'insertion (IS). Ainsi, alors que le génome de *B. bronchiseptica* ne contient que quelques IS, ceux de *B. pertussis* et *B. parapertussis* en contiennent beaucoup, dont les plus nombreuses sont assez spécifiques de chacune des 2 espèces : en moyenne plus de 240 copies de IS481 sont présentes dans les isolats cliniques de *B. pertussis* et environ 90 copies de IS1002 dans les isolats de *B. parapertussis* (Parkhill *et al.*, 2003a).

Le génome de *B. bronchiseptica* est composé de 5 338 400 paires de bases (pb), tandis que celui de *B. pertussis* en comprend 4 086 186. La faible diversification des gènes de *B. pertussis* par rapport à leurs homologues de *B. bronchiseptica* est en faveur d'une individualisation récente de l'agent de la coqueluche (Diavatopoulos *et al.*, 2005a), estimée entre 7 000 et 3,5 millions d'années (Parkhill *et al.*, 2003a). En 2014, l'étude de Marieke Bart *et al.* d'une collection mondiale de 343 souches de *B. pertussis* isolées entre 1920 et 2010 a mis en évidence deux groupes phylétiques distincts qui auraient divergé il y a environ 2 000 ans (Bart *et al.*, 2014). L'un d'eux, contenant 98 % des souches analysées, aurait commencé à prendre le pas sur l'autre il y a environ 500 ans, ce qui correspond aux premières descriptions d'épidémies de coqueluche en Perse et en Europe (cf. *supra*, p. 25).

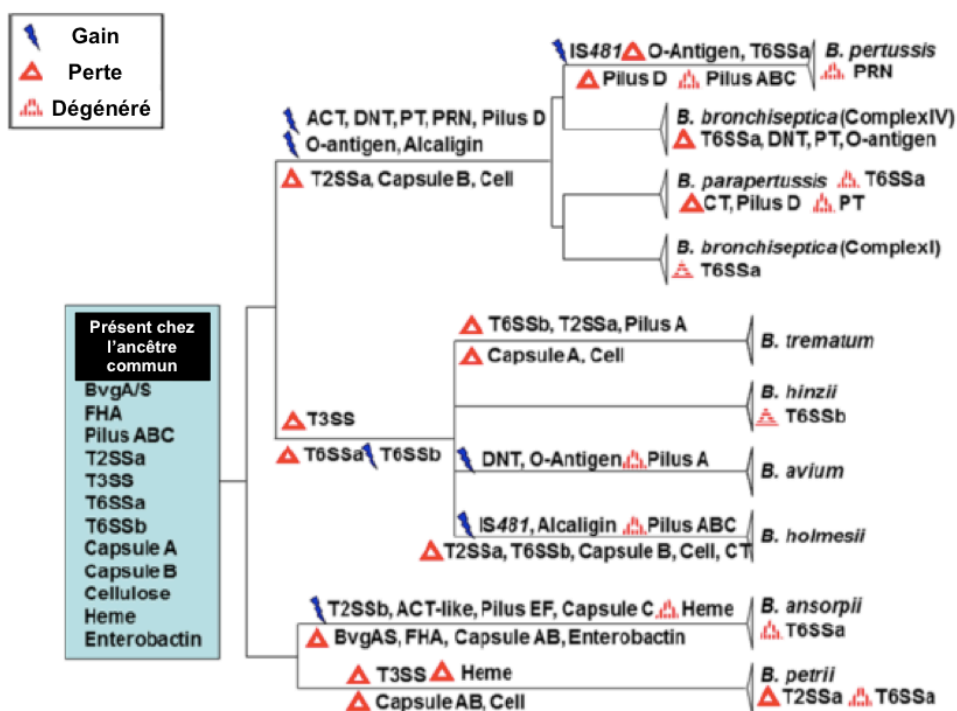


Figure 3 : Évolution des génomes de *Bordetella* ayant conduit à l'acquisition de facteurs de virulence au cours de la spéciation.

Adapté de Linz *et al.*, BMC Genomics, 2016.

Pouvoir pathogène de *B. pertussis*

L'analyse génomique de la souche de référence Tohama I indique la production probable de plus de 3 000 protéines (Mattoo & Cherry, 2005), la plupart prédites biologiquement actives et antigéniques (Nieves & Heining, 2016), parmi lesquelles se trouvent les facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion cellulaire, la production de toxines et la sécrétion de protéines effectrices (Locht, 1999).

Malgré les différences d'hôte et de spectre clinique, les 3 bordetelles classiques possèdent plusieurs facteurs de virulence communs, notamment des adhésines telles que l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), la pertactine (PRN) et les *fimbriae* (Fim), et des toxines comme la toxine adénylate cyclase (ACT, ou CyaA) et la toxine dermonécrotique (DNT) (Parkhill *et al.*, 2003b). Certains facteurs de virulence sont spécifiques d'espèce, en particulier la toxine pertussique (PTX) qui est uniquement produite par *B. pertussis* (Fig. 3). C'est aussi le cas du système de sécrétion de type VI (T6SS) chez *B. bronchiseptica* (Weyrich *et al.*, 2012), absent chez *B. pertussis* et probablement non fonctionnel chez *B. paraptussis* en raison de sous-ensembles de gènes manquants et/ou de la présence de pseudogènes dans la région qui l'encode (Park *et al.*, 2012).

1. Les adhésines sont responsables de l'attachement et de la colonisation de l'épithélium respiratoire par *B. pertussis*. Ces protéines de la surface bactérienne sont fortement exposées au système immunitaire.

L'hémagglutinine filamenteuse est une glycoprotéine essentielle à l'adhérence aux cellules épithéliales ciliées (Locht *et al.*, 1993) et à la persistance de l'infection par ses propriétés immunomodulatrices (Henderson *et al.*, 2012). Son expression est étroitement régulée par l'opéron *BvgA/S* (Scheller & Cotter, 2015).

La pertactine est une protéine de la membrane externe de la famille des autotransporteurs (Henderson *et al.*, 2004). Bien que son rôle ne soit pas encore complètement élucidé, des modèles *in vitro* suggèrent une fonction immunomodulatrice (Hovingh *et al.*, 2018), et un rôle d'adhésion aux cellules de mammifères par l'intermédiaire d'un motif tripeptidique Arg-Gly-Asp (Hijnen *et al.*, 2004) (Inatsuka *et al.*, 2010). De nombreuses études ont démontré ses propriétés immunogènes et protectrices, aboutissant à son utilisation dans la composition des vaccins acellulaires (Novotny *et al.*, 1991). La corrélation entre titres élevés

d'anticorps anti-PRN et protection contre la coqueluche confirme l'importance de cette protéine dans l'immunisation vaccinale (Cherry *et al.*, 1998). Cependant depuis 1998, des isolats cliniques de *B. pertussis* dépourvus de PRN ont été décrits, en particulier dans des pays utilisant le vaccin acellulaire (Pawloski *et al.*, 2014) (Zeddeman *et al.*, 2014) (Barkoff *et al.*, 2019).

Les protéines fimbriales, sont les monomères qui s'assemblent pour former les *pili* ou *fimbriae* filamenteux de la surface des bactéries. *B. pertussis* exprime deux types de *fimbriae* sérologiquement distincts constitués de sous-unités Fim2 ou Fim3 (Mooi *et al.*, 1987). Ces *fimbriae* sont capables de se lier aux polysides sulfatés du tractus respiratoire (Geuijen *et al.*, 1996) et contribuent à la colonisation du nasopharynx et de la trachée dans un modèle murin (Geuijen *et al.*, 1997) (Mattoo *et al.*, 2000).

2. Les toxines sécrétées par *B. pertussis* ont des effets cytopathogènes sur le tractus respiratoire, mais aussi systémiques (Scanlon *et al.*, 2019) (Fig. 5).

La **toxine pertussique** est l'un des facteurs de virulence les plus importants de *B. pertussis*. Ce complexe multimérique composé d'une sous-unité monomérique A et d'une sous-unité pentamérique B est assemblé dans l'espace périplasmique et exporté par un système de sécrétion de type IV (Kotob *et al.*, 1995). PTX est une toxine de la famille AB₅ (Stein *et al.*, 1994a), comme la toxine cholérique. La sous-unité B assure la fixation à un récepteur glycoprotéique sialylé de surface des cellules épithéliales (Stein *et al.*, 1994b), et permet la translocation intracytoplasmique de la sous-unité A (Locht *et al.*, 2011). Cette dernière catalyse l'ADP-ribosylation des protéines Gai1 et Gai3, mécanisme conduisant à une dérégulation des voies de signalisation. Il en résulte notamment une augmentation de la sensibilité à l'histamine, une inhibition de la migration des polynucléaires neutrophiles (PNN) (Andreasen & Carbonetti, 2008) et une modulation de la réponse immunitaire adaptative (Carbonetti *et al.*, 2004) (Martino *et al.*, 2006). PTX favorise également l'adhérence aux cellules épithéliales ciliées (Carbonetti *et al.*, 2003) et serait la principale responsable de la toux paroxystique de la phase d'état de la coqueluche (Hewitt & Canning, 2010) (Carbonetti, 2015). Enfin, la toxine est impliquée dans la lymphocytose caractéristique de la coqueluche (Mu *et al.*, 1994) (Funaki & Miyairi, 2015) (Fig. 4). Cette lymphocytose serait à l'origine de l'obstruction des vaisseaux pulmonaires de faible calibre provoquant l'hypertension pulmonaire sévère des formes les plus graves de la maladie (Donoso *et al.*, 2005). Bien que

présent dans le génome de *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*, le gène *ptx* n'est pas exprimé chez ces espèces, du fait de mutations dans sa région promotrice (Aricò & Rappuoli, 1987).

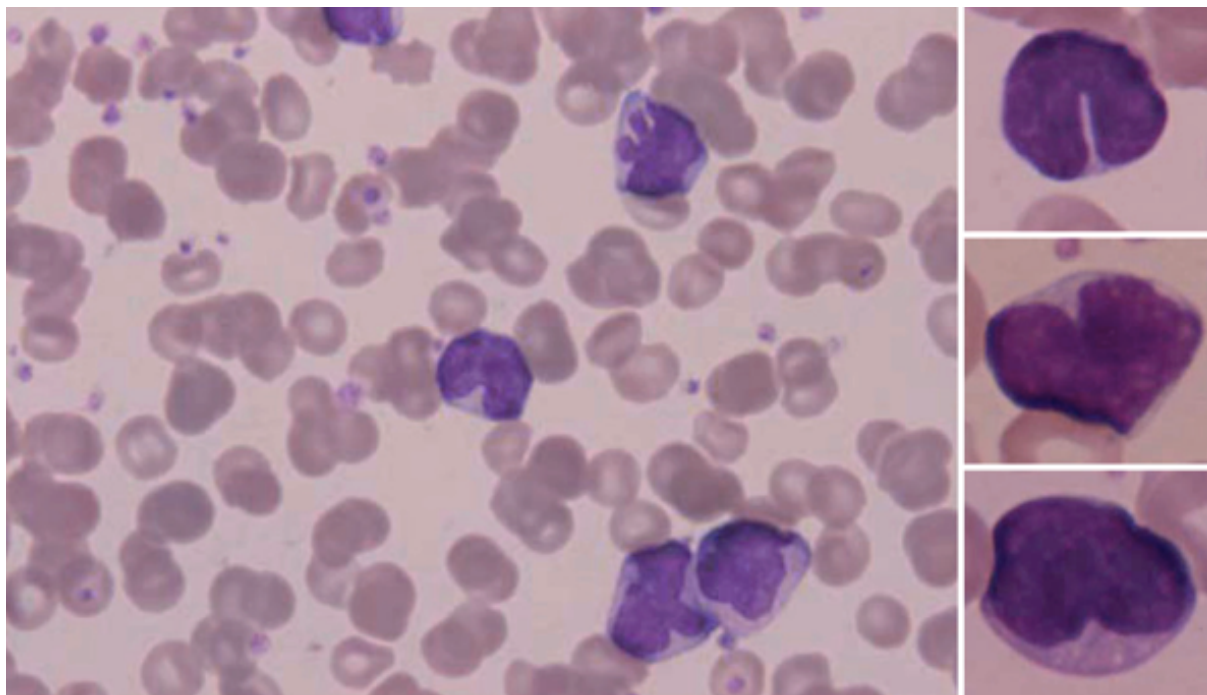


Figure 4 : Lymphocytose d'un patient atteint de coqueluche sévère.

Les éléments figurés sont des lymphocytes atypiques à noyaux clivés ou lobulés. Frottis de sang périphérique, coloration de May-Grünwald Giemsa, x 1000. Cliché Funaki *et al.*, Lancet Infect Dis., 2015.

L'**adénylate cyclase**, la **cytotoxine trachéale** (TCT) et la **toxine dermonécrotique** sont impliquées dans les dommages à l'épithélium respiratoire et la réponse immune. **CyaA** est excrétée par *B. pertussis* et seul son domaine catalytique pénètre dans les cellules cibles de l'hôte (Voegele *et al.*, 2018). L'activité biologique est alors activée dans le cytoplasme par la calmoduline et entraîne une dérégulation de la production d'AMPc intracellulaire. Les cellules effectrices de l'immunité semblent la cible principale de cette toxine, qui module ou supprime ainsi la réponse de l'hôte et facilite la survie de la bactérie. Dans le cas de la coqueluche, CyaA inhibe l'action des PNN (DI & Jw, 1982), et induit l'apoptose des macrophages alvéolaires (Gueirard *et al.*, 1998).

TCT est un fragment du peptidoglycane de *B. pertussis* (Rosenthal *et al.*, 1987), reconnu par le Toll-like récepteur Nod1 de l'immunité innée, ce qui active par la voie NF- κ B la production d'interleukine IL-1 α pro-inflammatoire provoquant des lésions de l'épithélium respiratoire (Flak & Goldman, 1999). L'équipe de Robert Wilson a

également démontré le rôle de TCT dans l'inhibition du chimiotactisme des PNN (Cundell *et al.*, 1994).

DNT est un polypeptide dont le rôle dans la physiopathologie de la coqueluche n'est pas complètement élucidé. Chez *B. bronchiseptica*, DNT induit un changement de la morphologie des cellules épithéliales par action sur la polymérisation de l'actine (Horiguchi *et al.*, 1997). Les séquences peptidiques des DNT de *B. bronchiseptica* et de *B. pertussis* étant à 99 % identiques (Teruya *et al.*, 2020), il est possible que la toxine y joue un rôle similaire lors de la coqueluche.

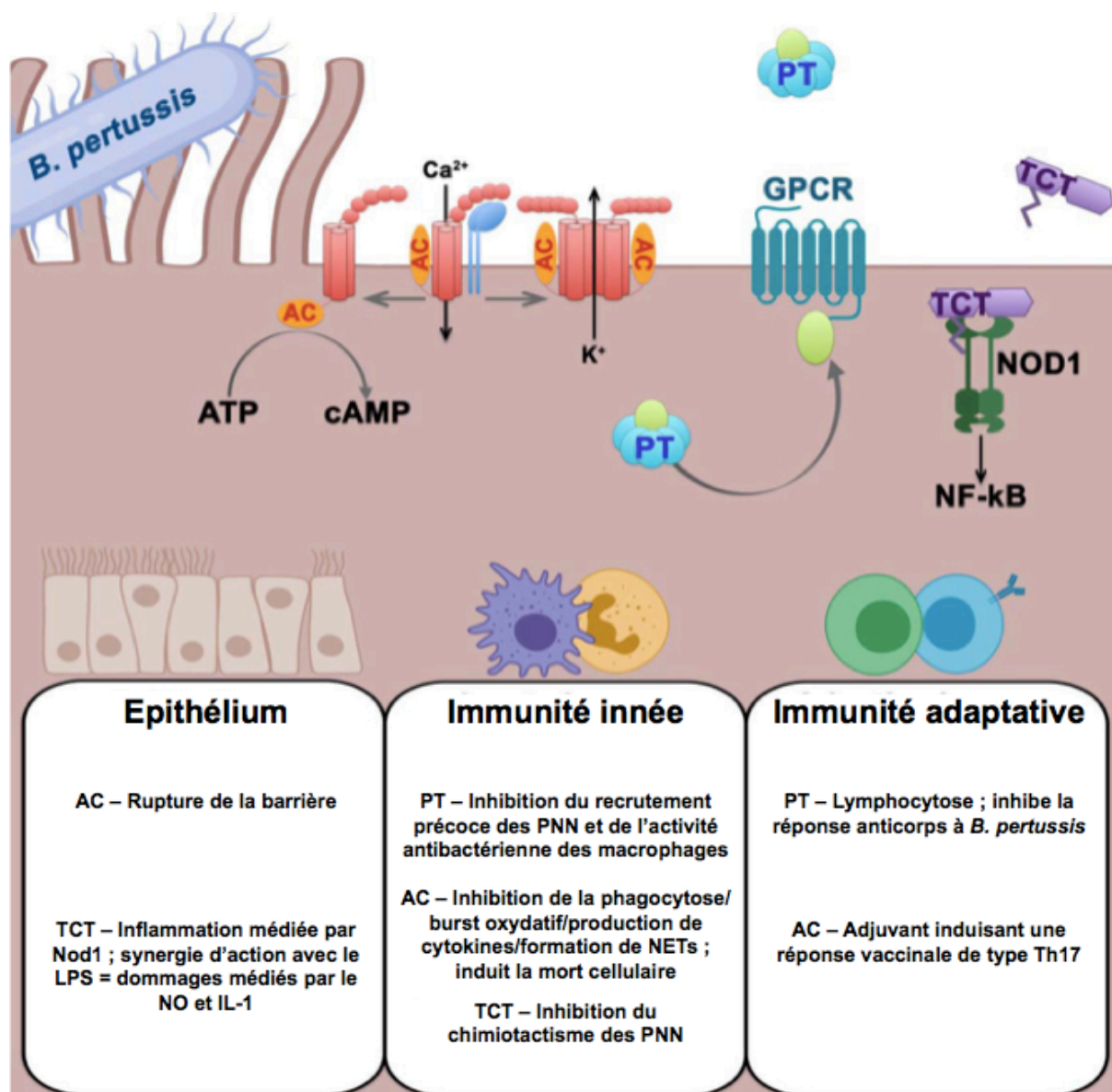


Figure 5 : Activités des toxines de *Bordetella pertussis* lors de l'infection.

PT : toxine pertussique, AC : adénylate cyclase, TCT : cytotoxine trachéale, LPS : lipopolysaccharide. Adapté de Carbonetti *et al.* Adv Exp Med Biol. 2020.

3. Régulation de la production des facteurs de virulence

L'expression de la quasi-totalité des protéines impliquées dans la virulence de *B. pertussis* est régulée par l'unique système à 2 composants BvgA/S (Hot *et al.*, 2003) (Cummings *et al.*, 2006) (Moon *et al.*, 2017). Lors de l'infection, des *stimuli* (comme une transition thermique de 25 à 37°C) provoquent l'activation d'un capteur de membrane interne à activité histidine kinase, BvgS, qui subit une autophosphorylation précédant la phosphorylation secondaire de la protéine BvgA. La protéine BvgA phosphorylée active la transcription des gènes de virulence (*virulence-activated genes* ou *vags*) par action directe sur leurs promoteurs. Le produit d'un de ces gènes est le régulateur BvgR qui réprime la transcription d'une autre catégorie de gènes (*virulence-repressed genes* ou *vrgs*) (Locht *et al.*, 2001). Parmi les nombreux gènes activés dans cette phase d'activation dite Bvg (+) se trouvent ceux des adhésines et toxines décrites *supra* (p. 31-34), requises pour établir l'infection dans l'arbre respiratoire de l'hôte (Herrou *et al.*, 2009). Lorsque les conditions ne sont plus celles de l'infection, la bactérie revient en phase dite Bvg (-) (Fig. 6) : BvgS n'est plus phosphorylé, l'expression des *vags* n'est plus promue au contraire de celle des *vrgs*. La phase Bvg (-) permet par exemple à *B. bronchiseptica* de vivre en dehors de son hôte, dans l'environnement, favorisant sa survie dans des conditions de carence nutritive (Porter *et al.*, 1991). Pour *B. pertussis*, les phases Bvg (-) et Bvg (i) (dans laquelle BvgA/S est partiellement activé) pourraient être nécessaires à la transmission d'un individu à l'autre et dans les stades initiaux de l'infection (Decker *et al.*, 2012) (Fig. 6).

Enfin, le système BvgA/S régule la production des biofilms qui semblent jouer un rôle-clé dans la colonisation persistante de *B. bronchiseptica* chez l'animal et dans la colonisation nasopharyngée par *B. pertussis* chez l'homme (Cattelan *et al.*, 2016) (Fullen *et al.*, 2020).

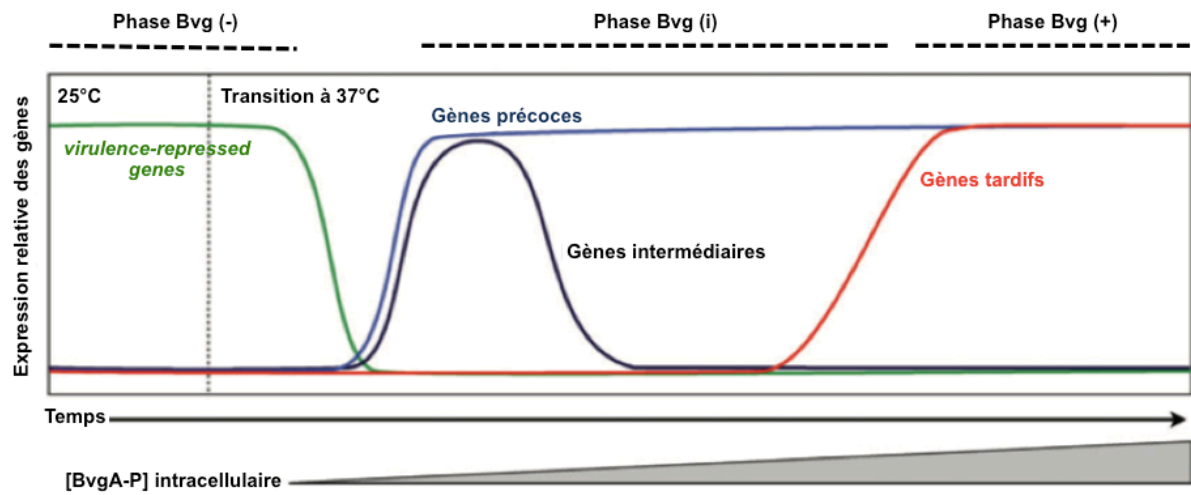


Figure 6 : Régulation des gènes de *Bordetella pertussis* par le système à 2 composants BvgA/S au cours d'un cycle infectieux.

Adapté de Decker *et al.*, Microbiology, 2012.

L'infection : la coqueluche et ses complications

Transmission

La coqueluche est une maladie exclusivement transmise par voie aérienne par l'intermédiaire d'aérosols de gouttelettes de sécrétions respiratoires disséminées par la toux d'un sujet contaminant (Warfel *et al.*, 2012). La coqueluche est hautement contagieuse avec un R_0 de 16 à 18 (nombre moyen de personnes qu'une personne contagieuse peut infecter), analogue à celui par exemple de la rougeole (Tang *et al.*, 2015).

La transmission se fait principalement à la faveur d'un contact intrafamilial ou en collectivité. Dans les études où était retrouvé le contact familial avec un cas index confirmé, le taux d'attaque (TA) moyen pour les enfants non vaccinés était de 76 % [64-86 %] (Storsaeter & Gustafsson, 1997) (Heininger *et al.*, 1998). Bien que les TA soient difficiles à quantifier en dehors du cadre familial, ils sont estimés dans les études portant sur les contacts scolaires entre 0 et 36 % (Rodman *et al.*, 1946) (Brennan *et al.*, 2000). Ces observations indiquent que la transmission de la coqueluche est favorisée par une exposition répétée ou prolongée, et/ou un contact étroit.

Le risque de contamination est maximal au cours de la phase initiale catarrhale puis diminue rapidement avec le temps. La contagiosité devient négligeable 3 semaines après le début des symptômes malgré la persistance des quintes de toux (von König, 2005). Elle peut être considérée comme nulle après 5 jours d'antibiothérapie par un macrolide (Bergquist *et al.*, 1987) (Cherry, 2018).

Bien que la gravité de la coqueluche soit essentiellement pédiatrique (Wood & McIntyre, 2008), sa chaîne de transmission implique adolescents et adultes en contact avec les jeunes enfants, en particulier parents et grands-parents, nourrices et personnels de santé (Forsyth *et al.*, 2005) (Kowalzik *et al.*, 2007). La diminution progressive de l'immunité post-vaccinale avec l'âge et l'absence de politique de rappels vaccinaux ont favorisé depuis 20 ans la contamination des nourrissons non encore immunisés par des adultes ou adolescents pourtant initialement vaccinés (Elliott *et al.*, 2004) (Wendelboe *et al.*, 2007). La vaccination de ces sujets à risque de transmettre la maladie aux plus jeunes est l'élément clé de la stratégie dite de *cocooning* mise en place dans plusieurs pays (Locht & Mielcarek, 2012).

Physiopathologie

La coqueluche résulte de la capacité de *B. pertussis* et dans une moindre mesure de *B. parapertussis* à coloniser l'épithélium des voies respiratoires supérieures en produisant de façon coordonnée les facteurs toxiques et/ou immunomodulateurs décrits dans les paragraphes précédents. L'activité de ces facteurs et la maturité des défenses de l'hôte déterminent l'évolution clinique et le spectre de la maladie au sein des différentes tranches d'âge.

L'étape initiale est l'adhésion aux cellules épithéliales ciliées du nasopharynx par l'intermédiaire de FHA, PRN et des protéines Fim (Bassinat *et al.*, 2000). Cette interaction réduit l'activité muco-ciliaire, donc la clairance physiologique des bactéries, provoquant la réaction catarrhale de l'hôte (cf. *supra*, p. 31-32). La production des toxines ACT et PTX inhibe localement la réponse immunitaire, réduisant notamment la migration et la phagocytose des macrophages et des polynucléaires neutrophiles. La phase d'état semble principalement due à l'activité tussigène de la toxine PTX (Hewitt & Canning, 2010) (Carbonetti, 2015), également responsable de la lymphocytose caractéristique de la maladie (Fig. 4).

Dans les formes les plus graves, la sécrétion des toxines TCT, DNT et ACT peut être responsable de lésions tissulaires des voies respiratoires supérieures puis inférieures, ainsi que de manifestations systémiques (Mattoo & Cherry, 2005). L'infiltration de la muqueuse par les leucocytes, et particulièrement les lymphocytes, a pour conséquence une hyperplasie lymphoïde des ganglions trachéo-bronchiques et une nécrose de l'épithélium bronchique (Smith & Vyas, 2000). L'hypertension pulmonaire est probablement un effet indirect de la PTX, qui provoquerait l'agrégation de lymphocytes dans le système vasculaire pulmonaire (Pierce *et al.*, 2000). Enfin, des analyses nécropsiques ont montré dans des cas de coqueluche fulminante des atrophies corticales du thymus et une déplétion lymphatique ganglionnaire et splénique (Sawal *et al.*, 2009).

Pouvoir pathogène naturel : chant du coq et coqueluche

À l'inhalation de gouttelettes de Flügge contaminées par *B. pertussis* ou *B. parapertussis* succède une période d'incubation de 7 à 10 j (extrêmes, selon l'inoculum initial et l'état immunitaire du sujet, 5-21 j). Puis, chez un jeune enfant non immunisé par exemple, une coqueluche typique se déroule en trois phases (Mattoo & Cherry, 2005) (Bouchez & Guiso, 2015) :

- Une **phase catarrhale** d'une à deux semaines, pendant laquelle la contagiosité est maximale et caractérisée par des symptômes de coryza banal : rhinorrhée claire, irritation des muqueuses oro-pharyngée et nasale avec toux légère et larmoiement. Fièvre et signes généraux (courbatures, malaise) sont la plupart du temps absents.

- Une **phase d'état paroxystique** d'environ 2 à 8 semaines, dominée par la toux sonore, avec une reprise inspiratoire difficile et évoquant le chant du coq (signe cependant inconstant chez le nourrisson et l'adulte). Les quintes sont épuisantes, insomniantes du fait de leur recrudescence nocturne, et fréquemment émétisantes chez le nourrisson avec un risque majeur de déshydratation. L'intensité et la fréquence des épisodes paroxystiques augmentent pendant quinze jours, puis diminuent progressivement pendant la **phase de convalescence** qui peut durer plusieurs semaines. Il est à noter qu'entre les accès de toux, le patient est asymptomatique et apyrétique.

- **Coqueluche « maligne »** : les nouveau-nés et nourrissons de moins de 3 mois peuvent présenter des complications cliniques mettant en jeu le pronostic vital : cyanose, détresse respiratoire, bradycardie, défaillance multiviscérale (Tanaka *et al.*, 2003). Cette forme de la maladie est responsable de la grande majorité des décès liés à la coqueluche (avis HCSP, 2014). Le taux de létalité de la coqueluche chez les enfants de moins de 3 ans est estimé entre 1 et 3 % (Murray *et al.*, 2013) (Winter *et al.*, 2015) et l'on estime qu'aux États-Unis, plus de la moitié des nourrissons atteints doivent être hospitalisés (Kilgore *et al.*, 2016). De plus, les surinfections bactériennes pulmonaires et infections virales associées ne sont pas rares, comme l'indique par exemple la présence d'une co-infection par le virus respiratoire syncytial (VRS) chez 33 % des nourrissons hospitalisés atteints de coqueluche dans une étude du début du XXI^e siècle (Crowcroft *et al.*, 2003a).

Adolescents et adultes sont moins symptomatiques que les jeunes enfants (Hewlett & Edwards, 2005) (Paisley *et al.*, 2012), les complications sont peu fréquentes et l'hospitalisation plus rarement nécessaire (Farizo *et al.*, 1992). À ces âges, la

coqueluche est le plus souvent diagnostiquée devant une toux persistante, paroxystique ou non, de plus de 3 semaines (Gilberg *et al.*, 2002) (Cornia *et al.*, 2010).

Un individu peut présenter 2 à 3 épisodes de coqueluche dans sa vie car l'immunité naturelle après l'infection ou une vaccination est comprise entre 7 et 20 ans (Schmitt-Grohé *et al.*, 1995) (Wendelboe *et al.*, 2005). La sévérité des récurrences est atténuée, mais l'âge, le sexe, l'espèce de *Bordetella* impliquée et le temps écoulé depuis la dernière infection ou vaccination paraissent également influencer sur la présentation clinique (Kilgore *et al.*, 2016).

Réponse immunitaire

Au décours de la primo-infection, on observe une réponse humorale (IgA, IgM puis IgG) dirigée notamment contre les adhésines FHA, PRN, Fim2, Fim3, et la toxine PTX (Viljanen *et al.*, 1982) (Mertsola *et al.*, 1990). La vaccination induit une réponse IgG analogue à celle de l'infection contre les facteurs de virulence inclus dans les vaccins ; c'est l'une des raisons pour lesquelles le diagnostic sérologique n'est plus recommandé dans les pays où la vaccination est systématique. La sérologie n'est pas non plus préconisée chez le nourrisson de moins de 3 mois, en raison de la présence possible d'anticorps maternels résiduels (Cherry *et al.*, 2005). Chez les adolescents et adultes enfin, la longévité de l'interférence vaccinale dépend notamment de la teneur en PTX immunisante, variable selon le vaccin utilisé (Le *et al.*, 2004) (Edelman *et al.*, 2007) (Pawloski *et al.*, 2012). Le facteur le moins immunogène semble être la toxine pertussique, 25 % des enfants (en particulier les nourrissons) et 10 % des adolescents et adultes ne produisant pas d'anticorps anti-PTX après l'infection (Stehr *et al.*, 1998) (Heininger *et al.*, 2004). Comme dans la plupart des infections rhino-pharyngées virales (*e.g.*, Covid-19), les taux d'IgG diminuent rapidement et deviennent indétectables chez de nombreux sujets dans l'année suivant l'infection (Versteegh *et al.*, 2005) (Dalby *et al.*, 2010).

Prise en charge thérapeutique de la coqueluche

Le diagnostic d'urgence de la coqueluche est essentiellement clinique et la prise en charge hospitalière sans délai des formes graves est souvent nécessaire en particulier chez les nourrissons âgés de moins de 3 mois (Murray *et al.*, 2013). Le traitement est alors avant tout symptomatique pour assister la respiration (position proclive, dégagement des voies aériennes, aspiration, oxygénothérapie) et corriger les désordres hydro-électrolytiques (réhydratation, renutrition). Il peut être complété en réanimation par oxygénation extracorporelle (ECMO) ou exsanguino-transfusion dans les formes majeures hyperlymphocytaires (avis HCSP, 2014).

Chez l'adulte comme chez l'enfant, l'antibiothérapie ne joue qu'un rôle secondaire dans le traitement. Elle est prescrite dans 2 cas, selon le même schéma posologique :

- traitement curatif d'appoint d'un patient en phase catarrhale pour diminuer durée et sévérité de la toux et pour réduire la contagiosité (von König, 2005).

- antibiothérapie prophylactique du sujet non ou insuffisamment vacciné ayant été en contact avec un patient coquelucheux dans les trois semaines suivant l'apparition de la maladie de celui-ci (Granström *et al.*, 1987) (Halperin *et al.*, 1999).

Parmi les macrolides qui sont le traitement de première intention, le choix se porte à ce jour sur (avis HCSP, 2014) :

- L'azithromycine 20 mg/kg/j (max. 500 mg/j) en prise unique journalière durant 3 j.

- La clarithromycine 15 mg/kg/j (max. 1 g/j) en 2 prises journalières pendant 7 j.

Cependant, l'émergence préoccupante en Chine d'une lignée de *B. pertussis* apparemment sélectionnée par sa moindre sensibilité aux vaccins acellulaires et dans laquelle la majorité des isolats a acquis une résistance aux macrolides par mutation de leur cible ribosomique pourrait remettre en cause ces recommandations (Xu *et al.*, 2019a) (Yao *et al.*, 2020).

Les bêta-lactamines étant sans effet thérapeutique dans la coqueluche, l'alternative habituellement envisagée est le cotrimoxazole (8 mg/kg/jour de triméthoprime chez l'enfant et 320 mg/jour chez l'adulte) pendant 14 jours (Hewlett & Edwards, 2005) sauf chez la femme enceinte ou allaitante et chez le nourrisson de moins de 2 mois pour lesquels ce traitement est contre-indiqué.

Stratégies de prévention : les vaccinations

Depuis son introduction aux États-Unis en 1940, la vaccination a permis de réduire le taux annuel moyen de coqueluche chez les enfants dans les pays qui la pratiquent de 160 à moins de 1 cas pour 100 000 habitants (Cherry, 1984) (Klein, 2014). Les vaccins, originellement constitués de bactéries entières inactivées (*whole-cell pertussis vaccine*, wPV), ont été associés dès 1959 aux anatoxines diphtérique et tétanique puis au virus inactivé de la poliomyélite pour l'immunisation des nourrissons dans l'objectif d'éradiquer à terme les 4 maladies de l'ensemble de la population. Concernant la coqueluche, l'efficacité des meilleurs wPV était supérieure à 90 % et en France, la durée de protection des enfants complètement vaccinés en 4 injections au cours des 18 premiers mois de vie était évaluée entre 7 et 9 ans (Grimprel *et al.*, 1996) (Guiso *et al.*, 2008). Cependant, l'utilisation de wPV fut remise en cause à la suite des critiques suivantes : (i) absence de prévention des rebonds cycliques de cas de coqueluche tous les 3 à 5 ans (Broutin *et al.*, 2010), (ii) absence de protection contre *B. parapertussis* (Kurova *et al.*, 2010), (iii) hétérogénéité de la production industrielle des wPV et surtout, (iv) des effets secondaires neurologiques avec lésions cérébrales décrits dès 1948 (Byers & Moll, 1948) (Baraff *et al.*, 1983), bien qu'il n'ait pas été possible d'en incriminer formellement les wPV (Mortimer *et al.*, 1983) (Mattoo & Cherry, 2005).

Plus reproductibles à fabriquer, des vaccins protéiques purifiés acellulaires (aPV) composés d'anatoxine pertussique combinée à une, puis plusieurs des adhésines majeures de *B. pertussis* (FHA, PRN, Fim2, Fim3) ont été développés, et remplacent les wPV dans la plupart des pays industrialisés (Sheridan *et al.*, 2014).

D'efficacité protectrice initiale similaire à celle des wPV, les aPV sont mieux tolérés à la primo-injection (Decker *et al.*, 1995), mais confèrent une immunité vaccinale moins durable de 6 à 7 ans (Klein *et al.*, 2012) (Guiso *et al.*, 2017).

Depuis 2018 les recommandations vaccinales sont les suivantes :

- primo-vaccination à l'âge de 2 mois, 2^e dose à 4 mois, puis rappel à 11 mois,
- rappels à 6 ans puis entre 11 et 13 ans,
- rappels à 25 ans puis tous les 10 ans pour le personnel soignant *sensu lato*, et les sujets amenés à s'occuper de nourrissons (stratégie de *cocooning*).

Diagnostic biologique de la coqueluche

Après s'être appuyé pendant plus de 80 ans sur la culture *in vitro* (et de façon indirecte sur le dénombrement des lymphocytes sanguins et la sérologie), le diagnostic au laboratoire de la coqueluche repose aujourd'hui principalement sur la détection d'ADN spécifique des *Bordetella pertussigènes*. Cependant, quelle que soit la méthode, l'isolement de bactéries viables ou la détection de matériel génétique ne sont possibles qu'au cours des 20 premiers jours d'infection (Heininger *et al.*, 1993) (Strebel *et al.*, 1993). Passé ce délai, seule la sérologie aurait un éventuel intérêt rétrospectif (Müller *et al.*, 1997), mais elle n'a plus sa place dans la stratégie diagnostique, en particulier dans les pays où une vaccination systématique dans la petite enfance a été mise en place depuis longtemps.

Dans ses recommandations les plus récentes, le Haut Conseil de la santé publique a établi un arbre décisionnel des modalités diagnostiques de la coqueluche selon la durée de la toux chez un patient suspecté (avis HCSP, 2014) (Fig. 7).

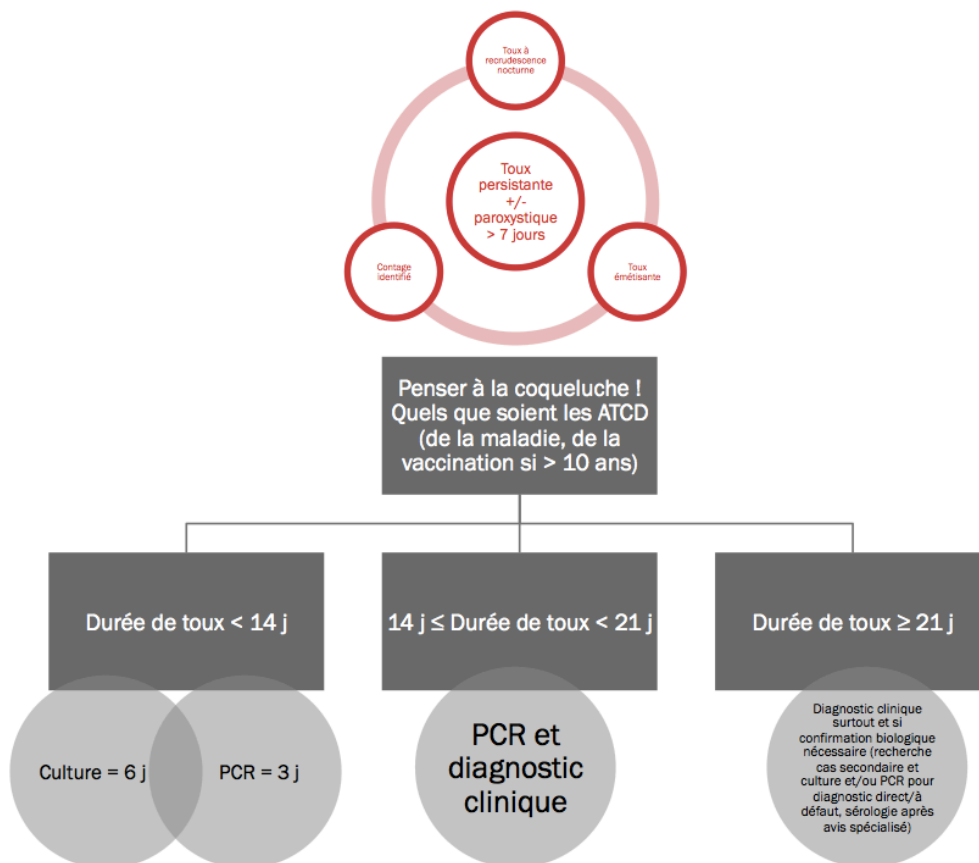


Figure 7 : Arbre décisionnel du diagnostic de la coqueluche en France.

La culture est recommandée jusqu'au 14^e jour de toux, la PCR jusqu'au 21^e. Au-delà, la recherche de cas secondaires est requise, chez qui un diagnostic par culture et/ou PCR pourra être réalisé (avis du HCSP, 2014).

1. Prélèvements biologiques recommandés : l'aspiration des sécrétions (Hallander *et al.*, 1993), et l'écouvillonnage nasopharyngé vrai (Fig. 8) sont préconisés pour la culture et la PCR (avis HCSP, 2014).

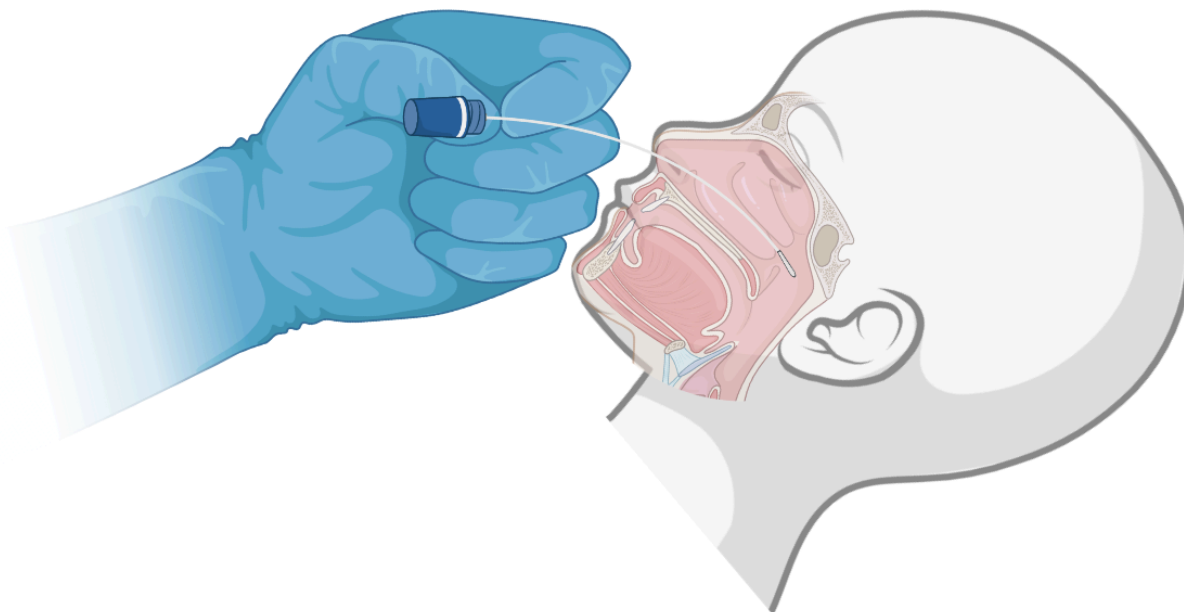


Figure 8 : Réalisation d'un prélèvement nasopharyngé avec un écouvillon fin et flexible.

Illustration C. Cordier, BioRender.

2. Culture *in vitro* : les principaux milieux gélosés utilisés pour l'isolement de *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* sont (Kerr & Matthews, 2000) :

- le milieu de Bordet-Gengou, constitué d'une macération de pomme de terre, source d'azote et d'amidon (ce dernier adsorbe et neutralise les acides gras et peroxydes inhibiteurs présents dans les sécrétions nasales), additionnée de glycérol (source supplémentaire de carbone et d'énergie), de 15 à 20 % de sang défibriné (mouton ou cheval) pour l'apport de facteurs nutritifs et vitaminiques et la mise en évidence de l'hémolyse de *B. pertussis*. Il est complétementé, dans les formulations contemporaines, de peptones animales variées qui le rendent plus fertile (Hoppe, 1988). Il a été rendu sélectif à partir des années 1960 par ajout de pénicilline G, remplacée depuis par la céfalexine (40 µg/ml) pour inhiber la pousse des principaux commensaux nasopharyngés. Son utilisation canonique prévoit l'ensemencement simultané de deux boîtes de gélose, l'une avec et l'autre sans sélecteur, afin de pallier un éventuel effet inhibiteur de l'antibiotique lorsque l'inoculum est paucibacillaire.

- le milieu Regan-Lowe, qui fonctionne sur le même principe mais sans pomme de terre, l'amidon étant remplacé par de la poudre de charbon et l'apport azoté

constitué de peptones animales. Il requiert moins de sang (10 %), mais une supplémentation en niacine, précurseur du NAD/NADP indispensable à la croissance bactérienne, et un antibiotique sélecteur, en général la céfalexine (Regan & Lowe, 1977).

Après 6 à 12 j d'incubation à 35°C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂, les colonies de *B. pertussis* sur milieu de Bordet-Gengou ont un aspect caractéristique en gouttelettes de mercure, bombées et à l'éclat métallique, produisant une hémolyse complète (bêta) des hématies de la gélose située sous les bactéries (Fig. 9). L'incubation au delà du 7^e j améliore significativement le rendement des cultures (Katzko *et al.*, 1996). *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* poussent plus vite (72 et 24-48 h, respectivement), produisant des colonies moins caractéristiques, mais nettement bien plus grandes (1-3 mm).

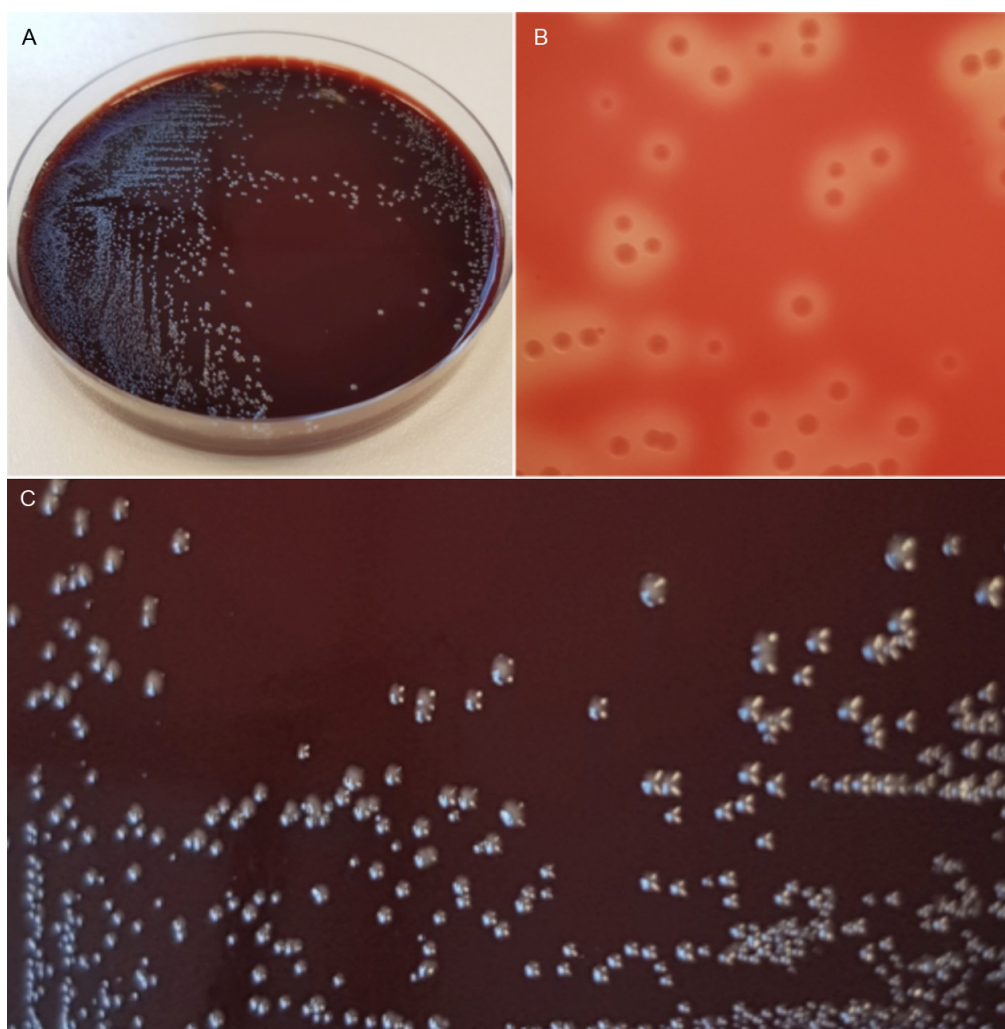


Figure 9 : Aspect colonial de *Bordetella pertussis* sur milieu de Bordet-Gengou.

(A, C) Colonies en gouttelettes de mercure. (B) Zone claire de bêta-hémolyse révélée par rétroéclairage. Incubation 7 j à 35°C, air enrichi de 5 % de CO₂. Photographies C. Cordier.

La sensibilité du diagnostic par culture dépend à la fois du stade de la maladie, de l'âge et du statut vaccinal du patient (Nakamura *et al.*, 2011), de la charge bactérienne, de la qualité du recueil et de la contamination par la flore microbienne commensale, et du délai entre le prélèvement et l'ensemencement (Vestrheim *et al.*, 2012) (Martini *et al.*, 2017). Elle est comprise entre 60 et 80 % dans les 2 premières semaines de toux, mais diminue rapidement en cas de prélèvement tardif (Halperin *et al.*, 1989) (Grimprel *et al.*, 1993).

En dépit de la difficulté d'isoler les bactéries en culture, principalement due à la nécessité de recourir à un milieu spécifique et à une durée d'incubation inhabituellement longue, l'identification de *B. pertussis* est ensuite assez facile. Les bactéries sont de tout petits coccobacilles à Gram négatif, à activité catalase. Elles produisent une réaction d'oxydase rapide et ne sont pas uréolytiques, à l'inverse de *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* (toutes deux oxydase⁻ et uréase⁺). L'identification définitive auparavant obtenue par agglutination par des antisérums spécifiques est aujourd'hui remplacée par la spectrométrie de masse-MALDI-ToF pour toutes les espèces de *Bordetella* (Zintgraff *et al.*, 2018).

3. Le diagnostic génétique par amplification génique (PCR) de la coqueluche est désormais la méthode utilisée en première intention dans la plupart des pays développés (Riffelmann *et al.*, 2005). Remboursée en France depuis 2011 par la sécurité sociale, elle présente les quatre avantages d'être plus rapide et sensible que la culture (van der Zee *et al.*, 2015), simple à mettre en œuvre et automatisable, mais le défaut de ne plus donner accès à la bactérie vivante pour l'analyse épidémiologique, l'antibiogramme ou l'étude de la virulence et de l'immunogénicité.

Comme mentionné dans l'introduction (cf. *supra* p. 25), le génome des *Bordetella* peut contenir de très nombreuses copies de séquences d'ADN de quelques centaines de bases, les IS dont certaines sont spécifiques d'espèce, ce qui fait d'elles des cibles de choix pour la PCR (McLafferty *et al.*, 1988). Ainsi la détection de IS481 présente chez *B. pertussis* et IS1001 présente chez *B. parapertussis* sont à la base de la plupart des tests PCR de la coqueluche. IS481 existant aussi chez *B. holmesii*, et occasionnellement chez *B. bronchiseptica* (van der Zee *et al.*, 1996) (Diavatopoulos *et al.*, 2006) (Tizolova *et al.*, 2013), on recherche en plus de ces cibles au moins une séquence hautement spécifique de *B. pertussis* (ex. séquence du gène *ptx* de la toxine pertussique ou de son promoteur) et éventuellement une

séquence comme h-IS1001-like spécifique de *B. holmesii* (Schmidt-Schläpfer *et al.*, 1997) (Templeton *et al.*, 2003).

Une grande variété de PCR *multiplex* commerciales combine la recherche de cibles de ce type pour assurer une bonne spécificité (Lind-Brandberg *et al.*, 1998) (Kösters *et al.*, 2001), mais ce sont IS481 et IS1001 qui assurent l'excellente sensibilité de la méthode (Roorda *et al.*, 2011), en raison de leur présence en grand nombre dans les génomes respectifs de *B. pertussis* et *B. parapertussis* (Diavatopoulos *et al.*, 2005b). Cette sensibilité et la possibilité d'évaluer semi-quantitativement la charge bactérienne par des techniques automatisées de suivi de l'amplification en temps réel (qPCR) font aujourd'hui de cette approche la technique de référence du diagnostic biologique de la coqueluche. La pertinence de la PCR par rapport aux autres éléments diagnostiques disponibles dépend du stade de la contamination et de l'infection (Fig. 10).

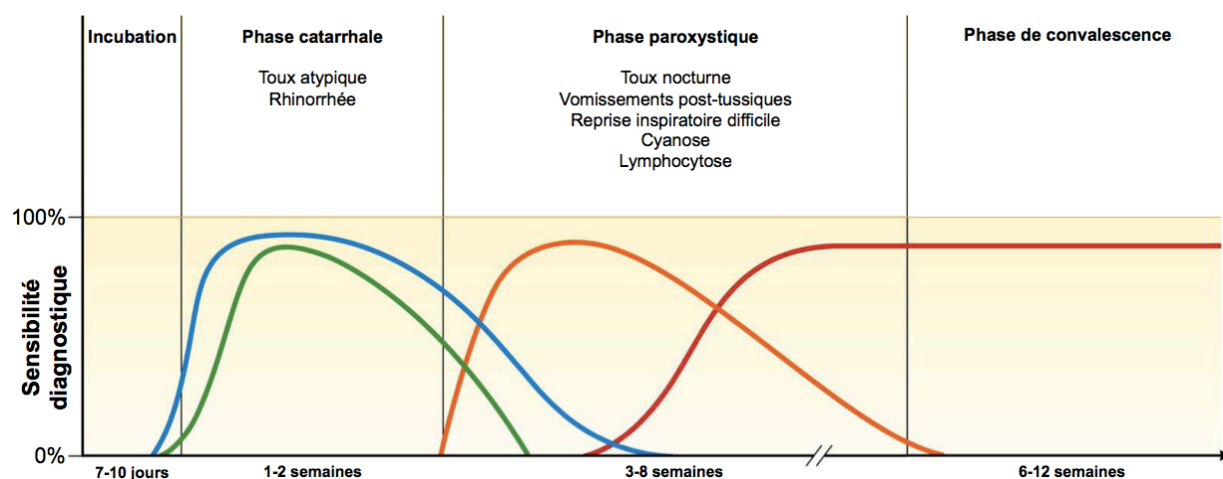


Figure 10 : Représentation graphique des sensibilités diagnostiques de la culture (vert), de la PCR (bleu), de la sérologie (rouge) et du diagnostic clinique (orange).

Adapté de van der Zee *et al.*, Clin Microbiol Rev., 2015.

Il n'en demeure pas moins que les techniques d'amplification génique ciblée ne donnent plus accès au microorganisme vivant, qui reste indispensable à l'analyse épidémiologique, à la mesure de la sensibilité aux antibiotiques, ainsi qu'à toute étude de l'évolution de la virulence et/ou de l'immunogénicité de *Bordetella pertussis*.

Typage épidémiologique des isolats de *B. pertussis*

Les outils de typage bactérien sont en constante évolution et s'appuient de plus en plus sur le séquençage génomique des bactéries (Hegerle & Guiso, 2013) (Mooi *et al.*, 2014). L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de digestion de l'ADN génomique par des endonucléases de restriction à l'aide de l'électrophorèse en champ pulsé (RFLP-PFGE), technique de référence au début du siècle (Mooi *et al.*, 2000), permettait de distinguer par exemple les souches circulantes des souches vaccinales. La comparaison de concaténations de plusieurs séquences de régions génomiques communes (*multilocus sequence typing*, MLST), puis d'un plus grand nombre (*e.g.*, *ribosomal proteins-MLST*, r-MLST), et enfin des génomes entiers permet maintenant non seulement de différencier les isolats, mais aussi d'établir leur phylogénie, de suivre leur diffusion spatiale et temporelle, et d'analyser l'évolution de leurs gènes de virulence, en particulier sous l'effet de la vaccination (Mooi, 2010) (Bart *et al.*, 2014) (Bouchez *et al.*, 2018).

Le coût matériel et humain de ces approches demeure cependant élevé, et les délais d'analyse sont encore beaucoup trop longs pour répondre aux situations d'urgence épidémiologique. L'obtention de réponses préliminaires dans ce contexte pourrait sans doute bénéficier de techniques d'analyse phénotypique rapides et peu coûteuses comme la spectrométrie de masse-MALDI-ToF (SM-MT) et la spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier (IR-TF), mais ces dernières restent encore à évaluer sur *Bordetella pertussis* (cf. *infra*, travail expérimental, 2^e partie).

Évolution des souches de *B. pertussis* depuis la vaccination

La prévention vaccinale anti-pertussique mise en place à grande échelle dans les années 1990 a réduit en quelques décennies une cause majeure de morbidité infantile dans le monde, et l'estimation du nombre de jeunes enfants morts de la coqueluche est passé de 390 000 en 1999 (Crowcroft *et al.*, 2003b) à 160 700 en 2014 (Yeung *et al.*, 2017). Cependant, des résurgences épidémiques continuent à se produire tous les 3 à 5 ans et la maladie est loin d'être éradiquée en 2021 (Safarchi *et al.*, 2016) (Bowden *et al.*, 2016) (Zomer *et al.*, 2018).

Si l'on considère que les vaccins utilisés ont initialement montré leur capacité à prévenir l'infection, la défaillance observée de la couverture vaccinale peut être attribuée à 2 causes principales, (i) l'insuffisance du nombre de sujets vaccinés efficacement (primo-vaccination et rappels), qui permet la circulation persistante de *B. pertussis*, (ii) l'échappement immunitaire, c'est à dire l'émergence de souches mutantes de *B. pertussis* contre lesquelles l'immunité vaccinale n'est plus suffisante pour prévenir l'infection ou la transmission ; les mutations peuvent concerner la structure ou le niveau de production des facteurs de virulence ciblés par la vaccination, au premier chef PTX, PRN et FHA dans le cas des aPV.

Ainsi ont émergé dans des pays à forte pression vaccinale des souches n'exprimant pas PRN (PRN⁻) et/ou FHA (Barkoff *et al.*, 2019), notamment en France où le CNR rapporte que 48,4 % des isolats français analysés ne produisaient pas PRN en 2018 (rapport annuel d'activité 2019, CNR). Selon les souches, la disparition de l'activité PRN a principalement pour support (i) l'inactivation du gène de PRN par insertion d'une copie de IS481 (plus rarement à des mutations ponctuelles ou des délétions intragéniques), ou (ii) des mutations de la séquence du promoteur du gène (Otsuka *et al.*, 2012) (Zeddeman *et al.*, 2014) (Xu *et al.*, 2019b). La principale pression de sélection des souches PRN⁻ est la production d'anticorps anti-PRN bactéricides chez les sujets vaccinés par les aPV (Lesne *et al.*, 2020).

Si les mutations inactivant PTX semblent rares, une souche française responsable d'un syndrome pertussique mineur présentait une délétion complète de l'opéron encodant les 5 sous-unités de la toxine (Bouchez *et al.*, 2009). En revanche, des variants aujourd'hui très répandus sont apparus dès 1988, dans le génome desquels le promoteur *ptxP1* de PTX est remplacé par un promoteur plus fort, *ptxP3*, entraînant une surproduction de la toxine par rapport à celle des souches pré-vaccinales (Mooi *et al.*, 2009) (Bart *et al.*, 2010) (de Gouw *et al.*, 2014). L'émergence des mutants *ptxP3* ayant fait suite à l'introduction des aPV en remplacement des wPV, il est probable qu'ils possèdent un avantage sélectif pour la survie de

B. pertussis chez les patients vaccinés, en particulier quand l'immunisation s'affaiblit au cours du temps (Lam *et al.*, 2012) (Bart *et al.*, 2014) (Sealey *et al.*, 2015). Récemment, cette lignée est apparue en Chine à la suite du remplacement complet en 2012 des wPV par les aPV, ce qui suggère que ces aPV sont insuffisamment immunogènes pour empêcher la propagation de cette lignée, dont la persistance est de plus favorisée par une résistance récemment acquise de la plupart des isolats aux macrolides (Yao *et al.*, 2020).

Deuxième partie : travail expérimental

Étude de la diversité des isolats cliniques de *B. pertussis* dans les Hauts-de-France entre novembre 2017 à mars 2019

Objectifs du travail

En 2010 la PCR IS481-1001 est devenue l'unique diagnostic des *Bordetella pertussis* en routine du laboratoire du CHU de Lille, centre de recours des Hauts-de-France pour le diagnostic microbiologique de la coqueluche. Depuis, une augmentation significative du nombre de cas a été détectée, sans qu'il soit possible de déterminer si celle-ci était seulement due à la plus grande sensibilité de la méthode, ou si l'on assistait à une recrudescence de la coqueluche dans la région. Si tel était le cas, nous ne disposons plus de moyen d'investigation des souches responsables, la culture systématique et les prélèvements requis pour celle-ci ayant été abandonnés comme dans la majorité des laboratoires français. Moins d'une décennie plus tard en 2018, alors que l'incidence annuelle était estimée par son réseau de médecins généralistes et pédiatres à 6 276 infections, le CNR de la coqueluche ne recueillait plus que 65 isolats de *B. pertussis* de toute la France, et aucun de notre CHU. Nous nous sommes alors proposés d'évaluer l'intérêt d'une culture systématique de *B. pertussis* à partir des seuls échantillons à notre disposition en routine, les aspirations ou écouvillonnages nasopharyngés destinés au diagnostic par PCR, après réalisation de celle-ci. Ce sont les résultats de ce travail et l'analyse initiale par deux techniques phénotypiques spectrométriques des isolats recueillis, que nous présentons ici.

Matériel et méthodes

Échantillons biologiques et caractéristiques des patients

Deux types d'échantillon ont été analysés entre novembre 2017 et mars 2019 :

- liquide d'aspiration recueilli dans 1 ml de milieu de transport liquide Amies,
- écouvillonnage nasopharyngé ESwab™ System for Bordetella Testing (Copan,

France) déchargé en milieu de transport liquide Amies.

Les échantillons étaient conservés pendant 2 h à 5 j à + 4°C jusqu'à analyse par PCR. Ils étaient ensuite replacés à + 4°C jusqu'au lendemain pour mise en culture lorsque la PCR s'était avérée positive, soit un délai de mise en culture de 24 h à 6 j selon le jour et l'horaire d'arrivée de l'échantillon.

Les données suivantes relatives aux patients présentant une PCR positive ont été recueillies rétrospectivement :

- Âge et sexe,
- Localisation géographique de la structure où le prélèvement avait été réalisé,
- Date de prélèvement.

Détection génétique de *B. pertussis*

- Extraction d'ADN : 500 µl d'échantillon étaient homogénéisés à l'aide de l'agitateur à billes MagNA Lyser (Roche Diagnostics), avant extraction automatique sur automate MICROLAB STARlet (Hamilton) avec le kit Nucleospin 8 Tissue (MACHEREY-NAGEL).

L'ADN purifié était conservé dans un volume de 500 µl à - 20°C.

- L'amplification génique des cibles IS481 (*B. pertussis*/*B. holmesii*), pIS1001 (*B. parapertussis*) et hIS1001 (*B. holmesii*) à l'aide du kit commercial qPCR multiplex RIDA® GENE Bordetella real-time PCR (R-Biopharm AG) était réalisée sur l'automate de qPCR 7500 ABI (Applied Biosystems) avec une prise d'essai de 25 µl ; 45 répétitions du cycle d'amplification étaient réalisées et la valeur du Ct (*cycle threshold*) était retenue pour l'analyse.

Souches bactériennes de référence

Les souches suivantes de la collection du laboratoire ont été utilisées comme contrôles :

- *B. pertussis* CIP 63.1 - ATCC 9797
- *B. parapertussis* LOG121
- *B. bronchiseptica* LOG720
- *B. holmesii* LOG465
- *B. hinzii* LOG506
- *B. trematum* LOG466

Toutes ont été réisolées deux fois à partir d'un aliquot congelé à - 80 °C sur milieu de Bordet-Gengou sans antibiotique puis traitées dans les mêmes conditions que les isolats cliniques de l'étude au cours des différentes expériences.

Culture et identification phénotypique

Quand la PCR était positive, l'ensemencement était réalisé à partir du reste d'échantillon disponible sur milieu de Bordet-Gengou préparé extemporanément dans le préparatoire du laboratoire. Brièvement, 36 g/l de base Bordet-Gengou agar Difco™ (Becton-Dickinson) étaient remis en suspension dans de l'eau distillée jusqu'à dissolution complète, puis stérilisés à l'autoclave 15 minutes à 121°C. Après refroidissement à 45°C, 200 ml/l de sang stérile défibriné de cheval (Thermo Scientific) étaient ajoutés et mélangés au milieu, sans et avec 4 ml/l d'une solution à 10 mg/l de céfalexine (Oxoïd), soit une concentration finale dans le milieu de 40 µg/ml. Pour chaque échantillon, 50 µl étaient ensemencés dans une boîte de Petri ronde contenant 25 ml de gélose avec ou sans céfalexine. Les géloses ensemencées étaient incubées à 35°C sous atmosphère enrichie de 5 % de CO₂ et observées chaque jour pendant une durée maximale de 10 j.

Les colonies suspectes (aspect en gouttelettes de mercure, bombées et à l'éclat métallique, produisant une hémolyse complète des hématies de la gélose située sous les bactéries, cf page 46, Fig. 9) étaient ensuite identifiées par spectrométrie de masse-MALDI-ToF à l'aide du système Microflex®/Biotyper (Bruker). L'identification d'une espèce de *Bordetella* était validée par l'obtention d'un score $\geq 1,8$ et une différence $\geq 0,2$ avec le score de l'espèce la plus proche.

Tous les isolats ont été ensuite conservés à - 80°C dans un milieu glycérolé.

Pour l'antibiogramme et les analyses spectrométriques, les isolats cliniques congelés ainsi que les souches de référence ont été repiqués deux fois sur gélose de Bordet-Gengou sans antibiotique, la pureté de la culture étant contrôlée par SM-MT.

Antibiogramme

Les CMI des macrolides érythromycine et azithromycine, et du lincosamide clindamycine, ont été déterminées pour chaque isolat par epsilométrie (E-test® bioMérieux) sur milieu de Bordet-Gengou commercial (Oxoïd) après 7 jours d'incubation à 35°C sous atmosphère enrichie de 5 % de CO₂. L'inoculum était réalisé par mise en suspension d'une culture pure de bactéries fraîchement repiquées dans 3 ml de bouillon Mueller-Hinton (Oxoïd) préchauffé à 37°C à une densité correspondant à la valeur 0,5 de l'échelle de McFarland. En l'absence de concentrations critiques définies pour *B. pertussis* ou de concentrations critiques PK/PD pour les macrolides et lincosamides, la résistance a été définie par une valeur de CMI supérieure d'au moins 4 dilutions à celle de la CMI médiane de la population la plus sensible.

Analyse spectrométrique des isolats

Spectrométrie de masse-MALDI-ToF

À partir de bactéries issues des mêmes conditions de culture que celles utilisées pour l'analyse en IR-TF, une nouvelle analyse SM-MALDI-ToF après extraction protéique par acide formique/acétonitrile selon les recommandations du fabricant, a été réalisée. Sur une cible métallique de 96 puits, 1,2 µl d'extrait de chaque isolat était déposé en triplicat, séché puis recouvert de 1,2 µl de matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA, Bruker). La plaque séchée était ensuite introduite dans le spectromètre Microflex (Bruker). Une fois l'analyse terminée, les spectres protéiques ont été analysés par le programme MBT Compass Explorer (Bruker), et les dendrogrammes réalisés par la méthode de regroupement des liaisons moyennes.

Spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier

Les isolats de *B. pertussis* et des souches de référence de quelques autres espèces proches ont été cultivés simultanément par le même opérateur, dans des conditions identiques d'ensemencement, de lot de milieu de culture (Bordet-Gengou sans antibiotique), de temps et conditions d'incubation (7 jours, 35°C, 5 % de CO₂).

Les expériences de IR-TF ont ensuite été réalisées sur l'appareil du laboratoire de Microbiologie du CHU d'Amiens, grâce à l'expertise du Dr Crespin Adjidé que nous tenons à remercier, ainsi que le Pr Nadine Lemaître.

Quinze microlitres d'une suspension très dense (standard McFarland ≥ 6) de chaque isolat dans de l'éthanol à 35 % étaient déposés en triplicat dans les puits d'une plaque 96 IR Biotyper. Après séchage, l'analyse était réalisée dans l'infrarouge moyen (4 000-400 cm⁻¹) par un spectromètre IR (Bruker Optics). Les spectres étaient acquis, visualisés et traités par le logiciel OPUS (Bruker Optics). Les données de la zone d'absorbance des polysaccharides (1 300-800 cm⁻¹) étaient ensuite normalisées par le logiciel. Un second programme, IR Biotyper (Bruker), établissait dendrogrammes et diagrammes de dispersion par comparaison des distances euclidiennes.

Analyses statistiques

Les variables quantitatives continues distribuées selon une loi normale étaient rapportées sous la forme moyenne \pm écart-type. Les variables quantitatives continues ou discrètes distribuées de façon asymétrique étaient exprimées sous la forme médiane [intervalle interquartile Q1-Q3, IQR]. Les tests *t* de Student et U de Mann-Whitney ont été utilisés pour la comparaison de variables quantitatives. Les tests statistiques étaient utilisés sous leur forme bilatérale avec un risque α de 5 %. Les analyses statistiques et graphiques ont été réalisées avec le logiciel R version 3.6.2 ou GraphPad version 7.0.

Résultats

Caractéristiques des patients positifs en qPCR coqueluche

De novembre 2017 à mars 2019, 1 119 échantillons nasopharyngés de patients différents ont été analysés en qPCR de coqueluche.

Aucun n'était positif pour *pls1001* et *hIS1001*, et 84 (7,5 %) étaient positifs pour *IS481* indiquant la présence d'ADN de *B. pertussis* dans chacun d'entre eux. Trois pics de fréquence ont été observés pendant l'étude, en février et septembre 2018, et janvier 2019 (Fig. 11).

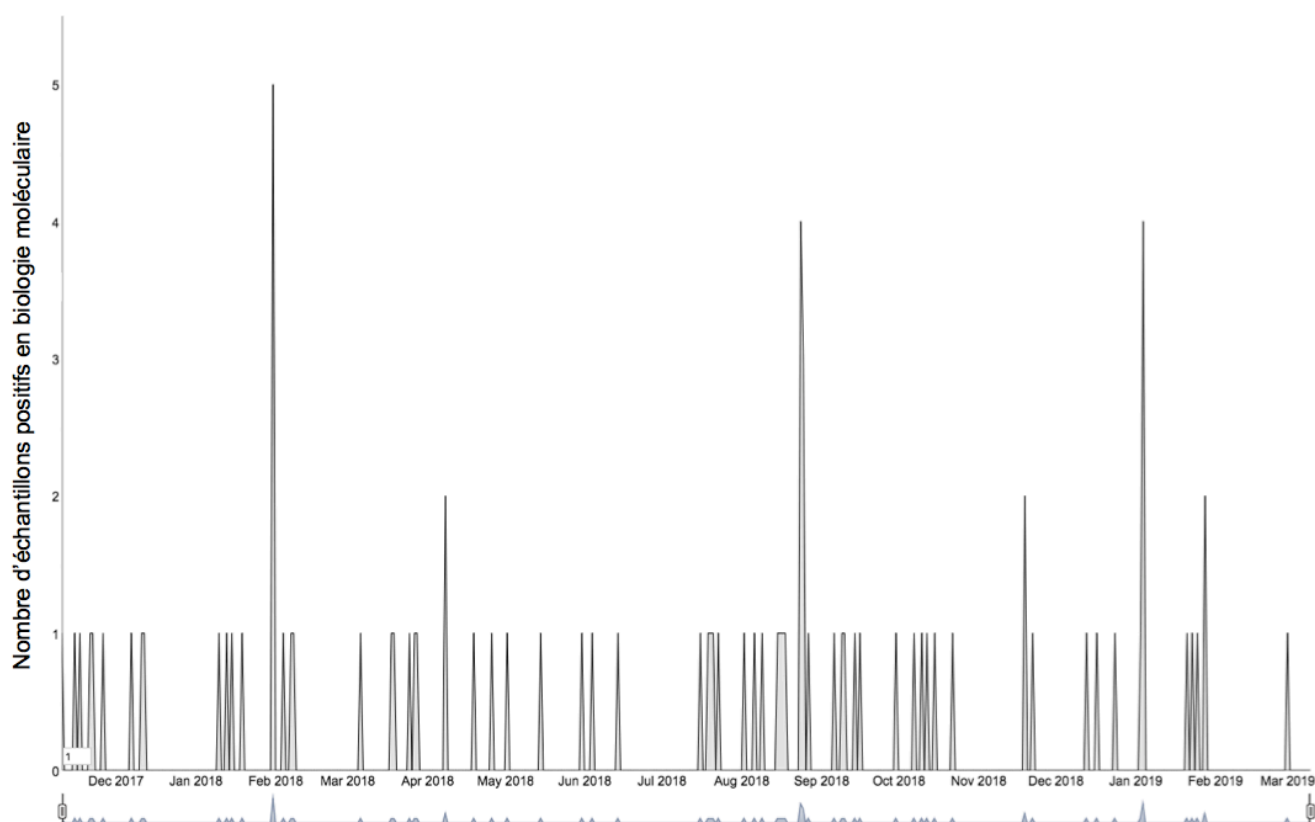


Figure 11 : Répartition temporelle des diagnostics positifs de coqueluche par qPCR IS481.

L'âge moyen des 84 patients positifs était $12,4 \pm 18,9$ ans, le *sex ratio* (F/M) de 1,4.

La valeur moyenne de Ct de qPCR était de 28 ± 7 . La distribution des valeurs de Ct (permettant d'évaluer la charge en ADN de *B. pertussis*) en fonction des groupes d'âge vaccinal des patients est représentée Figure 12. Les trois tranches d'âges les plus jeunes (périodes pré-vaccinale, post-1^{re} dose et post-2^e dose) présentaient des charges significativement plus élevées par rapport aux tranches d'âge les plus âgées, ayant reçu le rappel vaccinal du 11^e mois ($P < 1 \times 10^{-3}$).

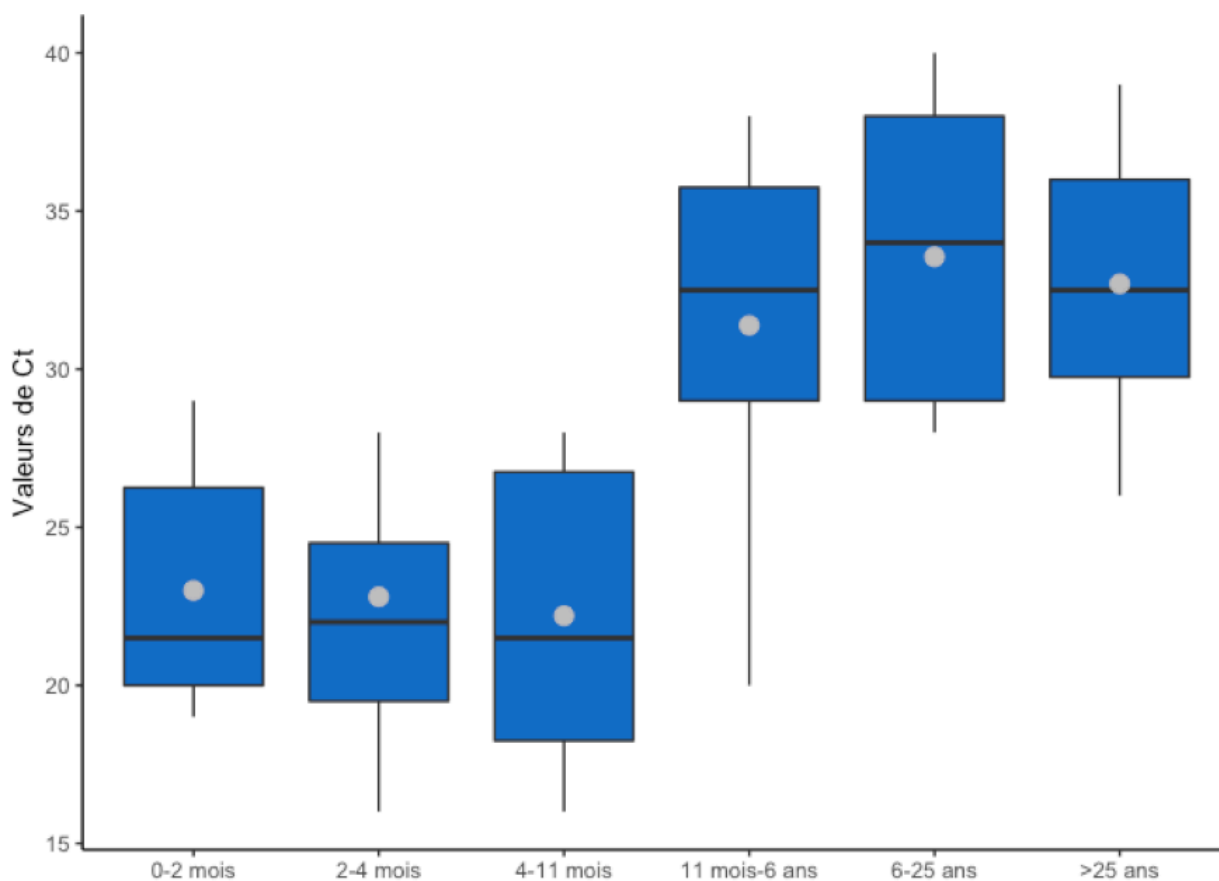


Figure 12 : Charge bactérienne et âge des patients au moment du diagnostic.

La charge bactérienne est inversement proportionnelle à la valeur du Ct de la qPCR coqueluche. Les tranches d'âges correspondent aux différents stades d'immunisation selon le schéma vaccinal actuel. Disques gris : valeur moyenne de Ct pour chaque tranche d'âge. Les boîtes bleues figurent l'espace interquartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, les lignes verticales s'étendent de la valeur la plus faible à la plus élevée.

Cinq cas de transmission familiale ont été identifiés, impliquant 2 à 5 membres par foyer (Fig. 13). À l'exception de la famille D, l'enfant le plus jeune du foyer, âgé dans chaque cas de moins d'un an, présentait le Ct le plus faible (≤ 29), donc la charge génomique bactérienne la plus élevée. À l'inverse, dans les familles A et D dont les autres enfants étaient plus âgés (2-6 ans), ceux-ci présentaient les charges bactériennes les plus faibles (Ct ≥ 36).



Figure 13 : Charge bactérienne estimée des patients dans les 5 foyers de transmission familiale.

Les cercles gris figurent l'échelle de Ct de l'amplification qPCR de IS481. La charge bactérienne est inversement proportionnelle à la valeur du Ct de la qPCR.

Isolement de *B. pertussis* en culture

L'obtention de colonies de *B. pertussis* sur milieu de Bordet-Gengou à partir des échantillons positifs en PCR (qPCR⁺) conservés à + 4°C a été possible dans près d'un tiers des cas (23 cultures positives pour 84 échantillons ensemencés, soit 27,4 %).

Le délai moyen de pousse permettant une identification par SM-MALDI-ToF sur milieu de Bordet-Gengou avec céfalexine était de 6 j [5-8 j]. Aucun isolat supplémentaire n'a été obtenu sur les géloses de Bordet-Gengou sans antibiotique, celles-ci étant systématiquement contaminées au bout de 2 j par une très abondante flore commensale de type cutané et/ou nasopharyngé.

Les échantillons qPCR⁺ dont la culture de *B. pertussis* était négative avaient une charge en IS481 significativement moindre que celle de ceux dont la culture était positive (Fig. 14). En effet, les valeurs de Ct de qPCR étaient significativement plus élevées pour les premiers : moyenne, 30 *versus* 22 pour les seconds, $P < 1 \times 10^{-4}$.

Au total 83,6 % des cultures négatives concernaient des échantillons qPCR⁺ de Ct > 24. Six échantillons de Ct > 24 (dont deux, Ct 34 et 35) ont néanmoins produit des colonies de *B. pertussis* viables. À l'inverse, 73,9 % (17 sur 23) des échantillons qui ont produit les bactéries en culture présentaient des valeurs de Ct ≤ 24.

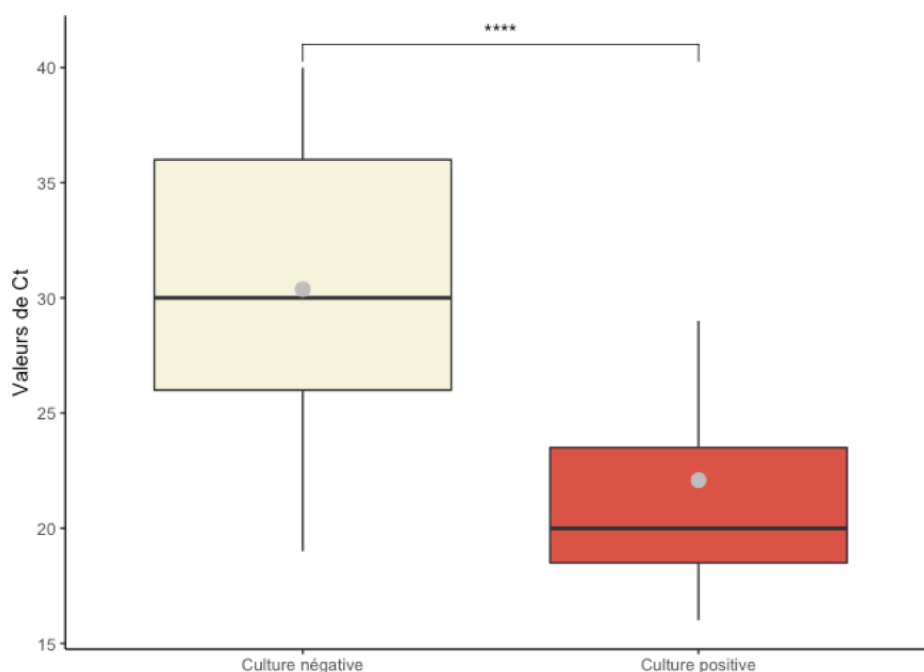


Figure 14 : Résultats de culture d'échantillons qPCR⁺ selon la charge génomique bactérienne.

La charge bactérienne est inversement proportionnelle à la valeur du Ct de la qPCR coqueluche. Disques gris : valeur moyenne de Ct. Les boîtes figurent l'espace interquartile, la barre horizontale indique la valeur médiane, les lignes verticales s'étendent de la valeur la plus faible à la plus élevée.

L'origine géographique des échantillons pour lesquels nous avons pu obtenir un isolat est présentée Figure 15. Si 15 sur 23 provenaient de la conurbation lilloise (Roubaix, n = 7, Lille, n = 5 et Tourcoing, n = 3), les 8 autres avaient été recueillis dans une vaste zone s'étendant de Calais (n = 3) à Sarreguemines (n = 1), en passant par Arras (n = 1), Cambrai (n = 1), Commercy (n = 1) et Épinal (n = 1).

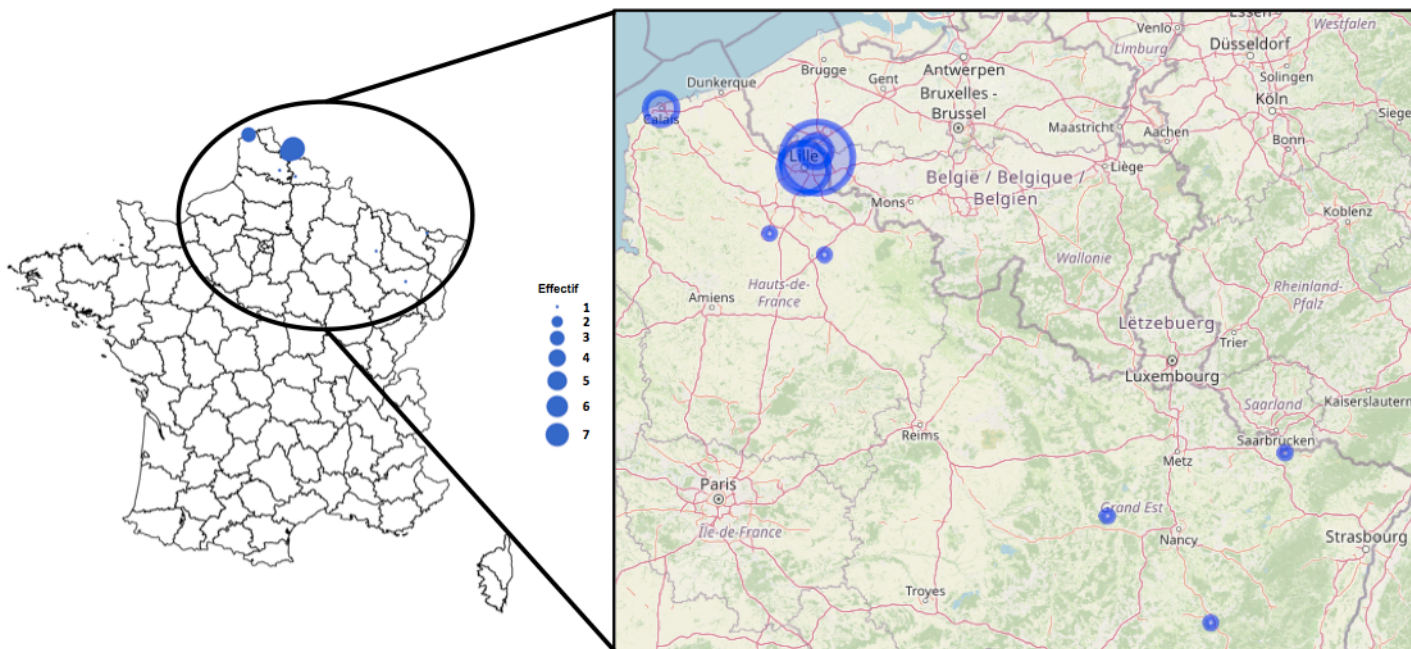


Figure 15 : Origine géographique des isolats de *Bordetella pertussis*.

Cercles bleus de diamètre proportionnel au nombre d'isolats.

Sensibilité aux macrolides et apparentés

Les 23 isolats étaient sensibles à l'érythromycine et à l'azithromycine. Cependant, 5 d'entre eux (21,7 %) présentaient une CMI ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ de clindamycine, dont 3 une CMI ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 16). Cette résistance était hétérogène, avec une zone d'inhibition nette évoquant une population sensible et une repousse fine mais abondante de colonies à l'intérieur de cette même zone.

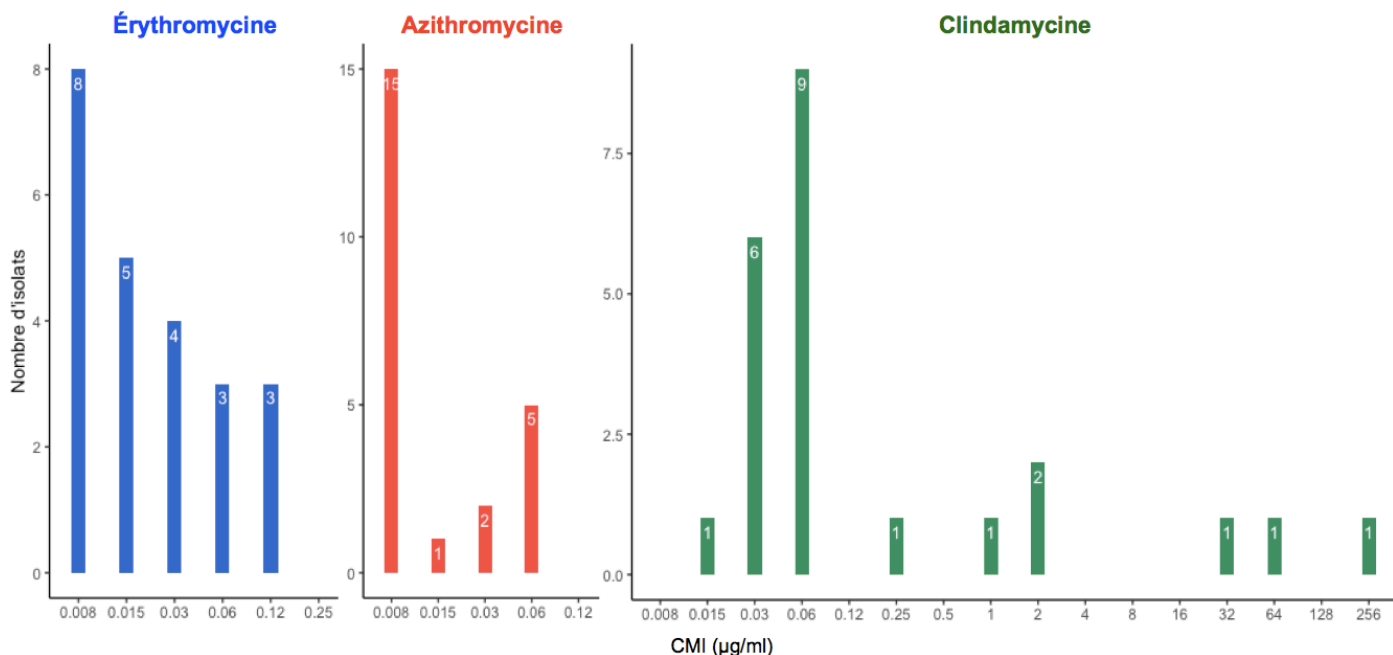


Figure 16 : Sensibilité aux macrolides et lincosamides des isolats de l'étude.

Évaluation de la diversité des isolats par SM-MALDI-ToF

Bien que conçu pour identifier des espèces bactériennes, le système de diagnostic SM-MT Bruker-Biotyper propose aussi un outil d'investigation épidémiologique intra-spécifique rapide par comparaison des spectres obtenus lors de l'identification. Un programme évalue le degré de similarité spectrale d'isolats d'une même espèce, présenté sous forme d'une matrice de distance ou d'un dendrogramme. Nous l'avons utilisé pour comparer les 23 isolats cliniques issus de la 1^{re} partie de ce travail, en leur adjoignant une souche historique de référence de *B. pertussis* (ATCC 9797) et un isolat clinique de *B. bronchiseptica*. Comme attendu, le spectre de ce dernier était suffisamment distinct de tous les autres pour le situer hors-groupe et permettre d'enraciner ainsi le dendrogramme (Fig. 17). Plus étonnamment, la souche de référence ATCC 9797 était très éloignée de l'ensemble des isolats cliniques de notre étude (Fig. 17). Selon les critères proposés par le fabricant, ceux-ci (23/23) formaient un groupe ou *cluster* unique, très homogène pour 18 d'entre eux, indifférenciables par cette technique (Fig. 17, isolats 1069 à 1079, de haut en bas). Les 5 isolats restants du *cluster* présentaient une moindre similarité spectrale (plus grande « distance évolutive »), en particulier l'isolat 1138, le plus distant (Fig. 17).

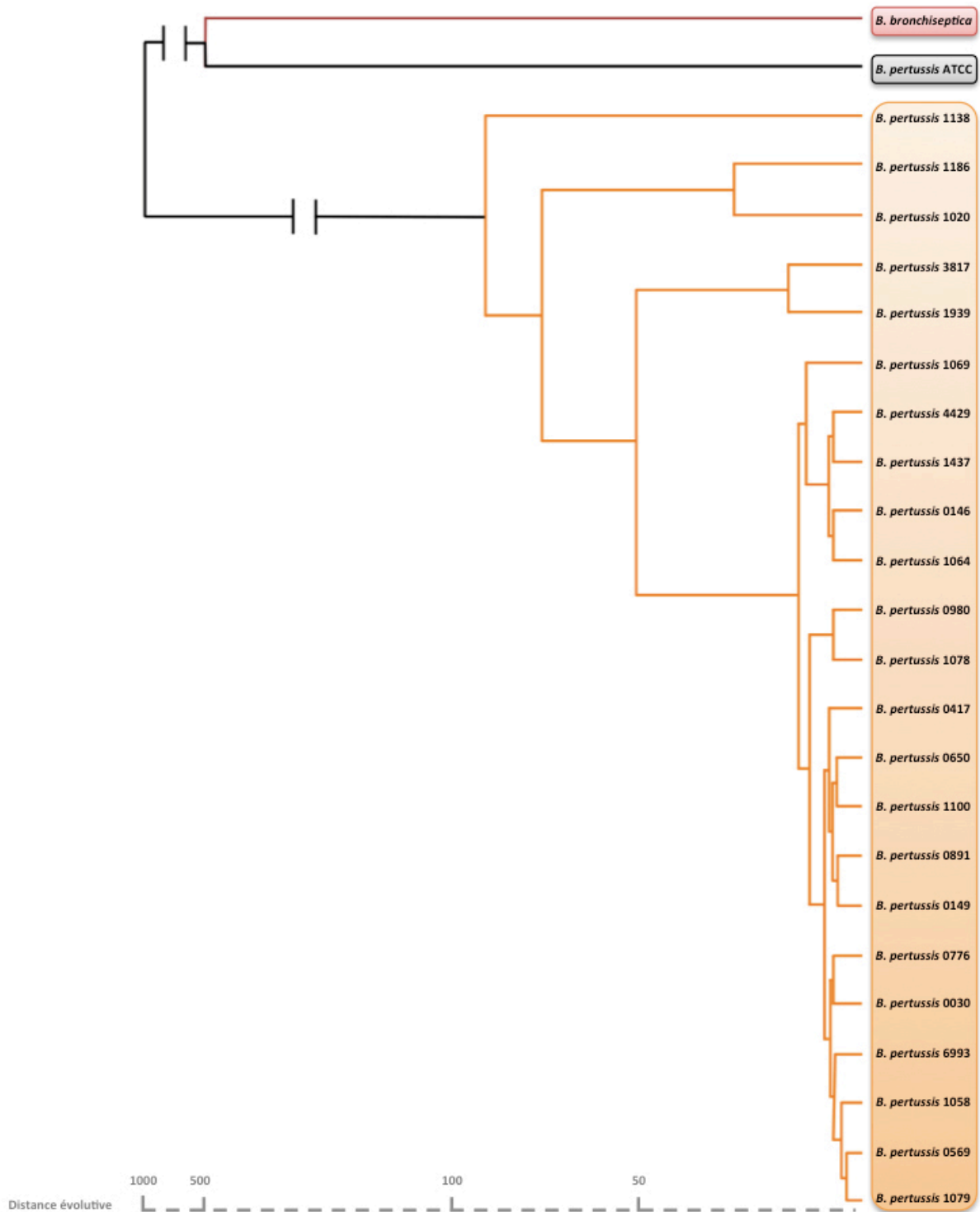


Figure 17 : Dendrogramme évolutif déduit des données de spectrométrie de masse-MALDI-ToF.

Cartouche orange : isolats cliniques de l'étude. Cartouche rouge : espèce hors-groupe : *B. bronchiseptica* LOG720. Cartouche noire : souche de référence *B. pertussis* CIP 63.1/ATCC 9797. Distance évolutive exprimée en unités relatives arbitraires. Comparaison et dendrogramme réalisés par le logiciel MBT Compass (Biotyper).

Évaluation de la diversité des isolats par IR-TF

Bien que l'appareil utilisé produise un spectre d'absorbance infrarouge de l'ensemble des liaisons chimiques des composants de surface des bactéries entières (Fig. 18), seules les données spécifiques aux liaisons C-O des polysaccharides (en violet, Fig. 18) sont à ce jour exploitées pour l'analyse épidémiologique.

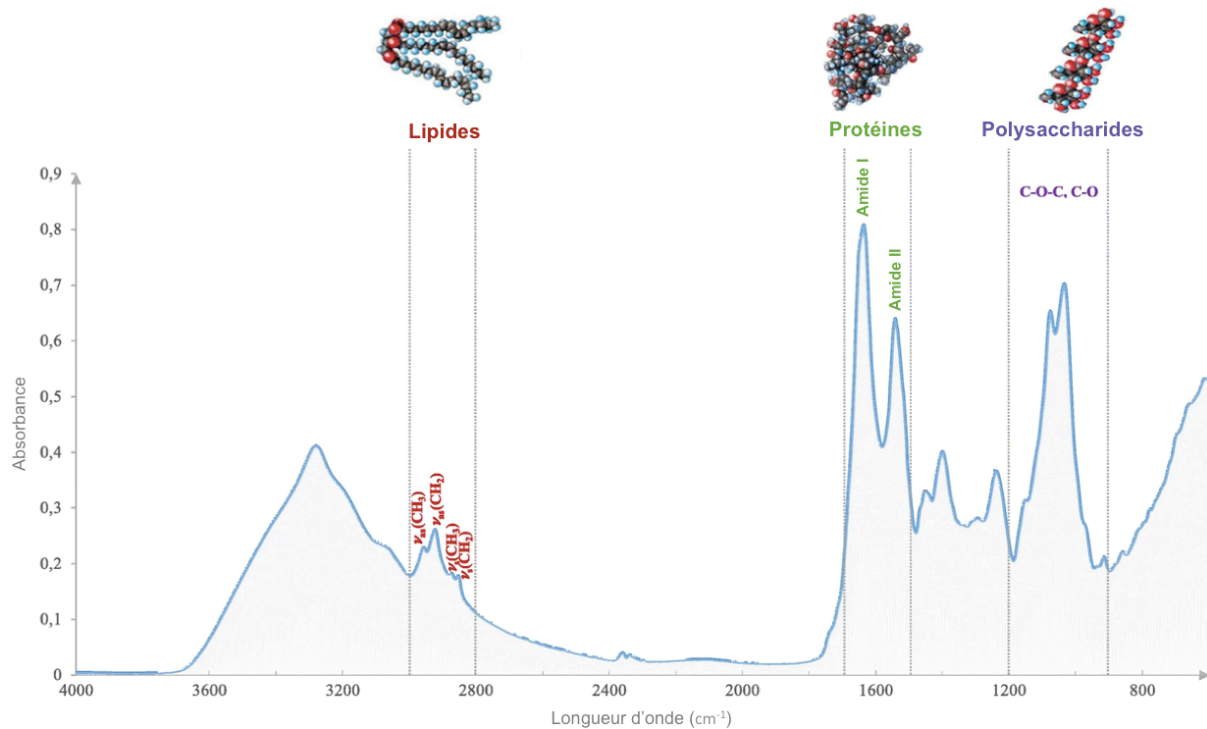


Figure 18 : Spectre d'absorbance infrarouge bactérien obtenu par spectrométrie IR-TF.

Les fenêtres spectrales correspondent aux longueurs d'onde de la région des (i) lipides (3 000-2 800 cm^{-1}) ; (ii) protéines/peptides (1 800-1 500 cm^{-1}) et (iii) polysaccharides (1 200-900 cm^{-1}). Adapté de Novais *et al.*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 2019.

Le système n'ayant jamais été utilisé à partir d'un milieu à l'amidon et pour des bactéries à croissance aussi lente et fastidieuse que *B. pertussis*, nous l'avons évalué en deux temps :

1. Évaluation préliminaire de la technique pour discriminer des espèces différentes.

Chaque espèce testée apparaissait distincte et indépendante des autres, *B. parapertussis*, *B. holmesii* et *B. bronchiseptica* étant les espèces les plus proches du groupe des isolats de *B. pertussis* contenant les isolats cliniques et la souche ATCC 9797 (Fig. 19).

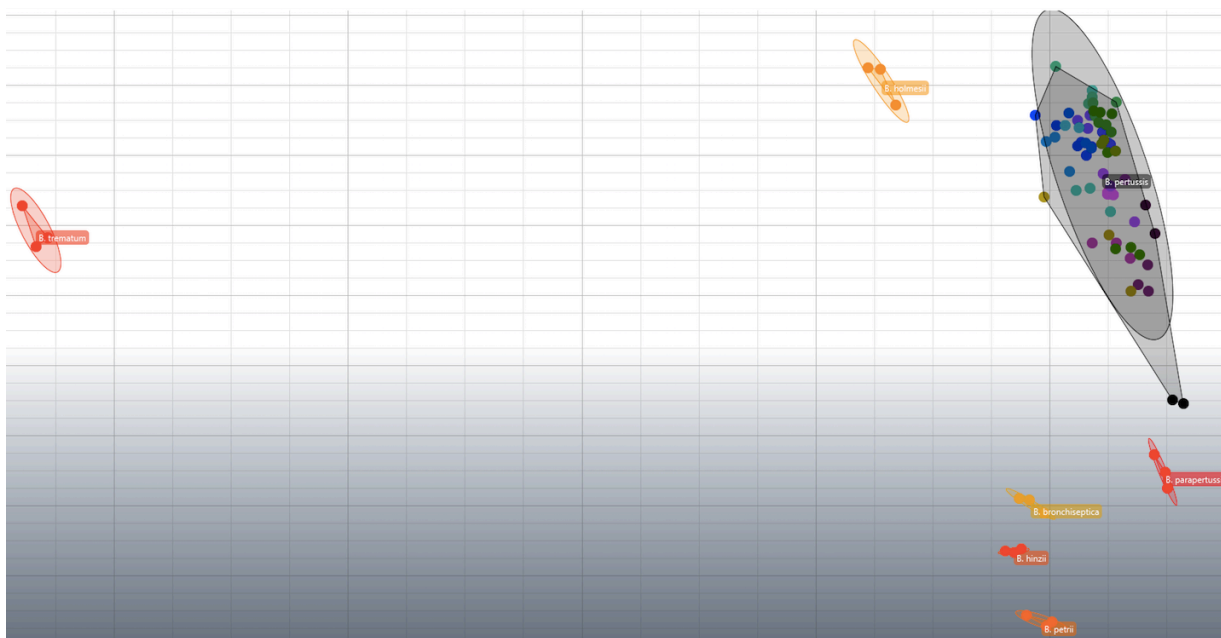


Figure 19 : Diagramme de dispersion des spectres infrarouges des isolats de 7 espèces de *Bordetella*.

Chaque point correspond à une mesure, chaque isolat étant étudié par 3 mesures indépendantes (dépôts en triplicat). Les distances relatives ont été déterminées par le logiciel IR Biotyper.

2. Diversité des isolats cliniques et de la souche de référence CIP 63.1 - ATCC 9797.

L'unique expérience que nous avons pu réaliser au CHU d'Amiens a permis d'obtenir des spectres exploitables pour 21 des 23 isolats de *B. pertussis* de l'étude. L'analyse des données spectrales entre 1 300 et 800 cm^{-1} indique qu'à l'exception d'un isolat apparemment indépendant (1138, Fig. 20, cartouche rouge), tous les isolats cliniques étaient regroupés dans un unique *cluster* (Fig. 20, cartouche orange), en revanche très distant de la souche-type de référence.

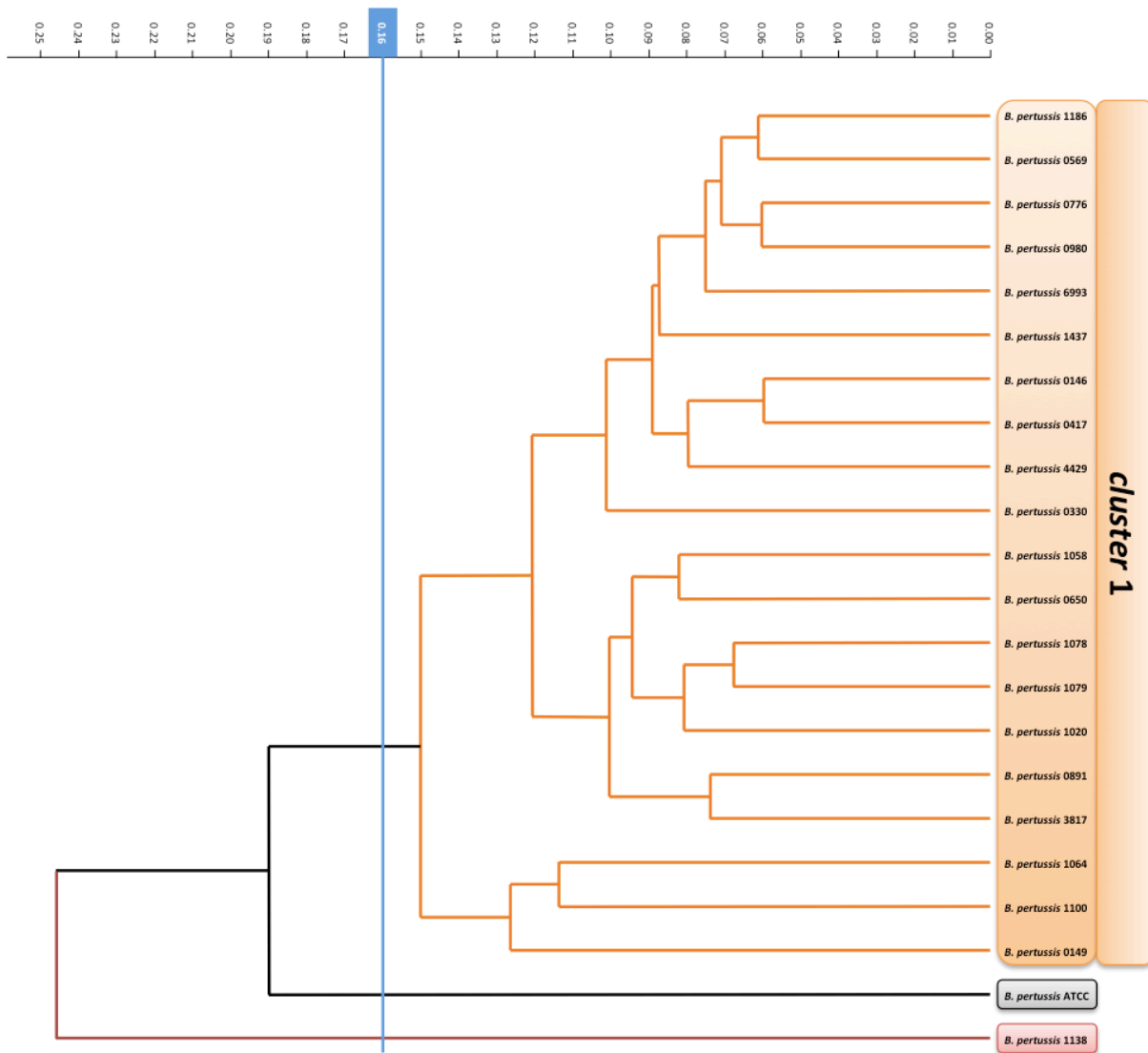


Figure 20 : Dendrogramme évolutif déduit des données de spectrométrie IR-TF.

Cartouches orange ou rouge : isolats cliniques de l'étude. Cartouche noire : souche de référence *B. pertussis* CIP 63.1 - ATCC 9797. Distance évolutive exprimée en unités relatives. Ligne verticale bleue : valeur seuil arbitraire d'interprétation. Comparaison et dendrogramme réalisés par le logiciel IR Biotyper (version 2.1.0.195).

Discussion et perspectives

Intérêt et faisabilité de cultiver *B. pertussis* XXI^e siècle. Le premier objectif de ce travail était de confirmer la possibilité déjà évaluée par un travail fondateur (Vestrheim *et al.*, 2012), de cultiver *B. pertussis* à partir d'échantillons destinés au diagnostic moléculaire et conservés jusqu'à obtention d'un résultat positif de PCR. Notre préoccupation étant d'obtenir des isolats représentatifs des cas de coqueluche de notre population sans disposer d'échantillons dédiés à la culture, nous nous sommes placés dans la routine de notre laboratoire après l'étape du diagnostic par PCR, avec un délai de mise en culture qui pouvait aller de 24 h à 6 j après le prélèvement (dont au moins 18 h à + 4°C). Nous avons obtenu un rendement de culture légèrement supérieur à celui de Vestrheim *et al.* (27,4 % vs 20,2 %), possiblement grâce à l'utilisation de milieux de Bordet-Gengou fraîchement produits dans notre préparatoire et utilisés extemporanément.

Comme ces auteurs, nous avons constaté que lorsque la charge bactérienne (estimée par la valeur de Ct de PCR IS481) était faible (Ct > 24), le rendement de la culture chutait fortement. Nous n'adhérons cependant pas complètement à leur recommandation de ne cultiver que les échantillons pour lesquels Ct ≤ 24. Ainsi, un quart des isolats que nous avons pu obtenir provenaient d'échantillons de Ct > 24. Au vu du faible taux de succès de la PCR coqueluche en routine diagnostique, où seuls 5 à 12 % des échantillons sont positifs (Schmidt-Schläpfer *et al.*, 1997) (Farrell *et al.*, 1999), il paraît raisonnable pour un laboratoire qui maintiendrait une activité de culture d'ensemencer tous les échantillons PCR IS481⁺, s'assurant ainsi de la représentativité épidémiologique satisfaisante de la population d'isolats obtenus.

Pour exemple de cette représentativité, nous disposons d'isolats de 3 des 5 *clusters* de coqueluche intrafamiliale que nous avons détectés au cours des 16 mois de l'étude. Dans chacune des familles, les membres testés ont tous été diagnostiqués par PCR IS481⁺, avec Ct élevé pour les sujets anciennement vaccinés (adultes ou grands enfants n'ayant pas reçus de rappel), et Ct faible chez les plus jeunes enfants de chaque foyer, âgés de moins d'un an dans chaque cas (Fig. 13). La charge bactérienne étant plus forte chez ces derniers, leurs échantillons ont produit des bactéries en culture dans la plupart des cas.

Disposer de ce type de souche est essentiel pour la surveillance des épidémies dont on sait qu'elles se déclenchent principalement dans le contexte familial (Mertsola *et al.*, 1990) (Raymond *et al.*, 2007) (de Greeff *et al.*, 2010).

Sensibilité aux antibiotiques des isolats obtenus. Alors que la résistance aux macrolides, famille de référence de l'antibiothérapie de la coqueluche, a émergé et semble prévalente dans certaines régions du monde (Li *et al.*, 2019) (Yao *et al.*, 2020), elle n'était pas présente chez nos isolats. En revanche, nous avons observé dans 3 cas une résistance hétérogène non encore décrite à la clindamycine, qui n'est pas de la classe des macrolides, mais agit sur la même cible ribosomique dans la sous-unité 50S que ces derniers. Une résistance hétérogène ayant été décrite pour l'azithromycine (Wilson *et al.*, 2002), il serait intéressant d'étudier ces isolats, par exemple à la recherche d'un mécanisme d'efflux touchant les lincosamides.

Application de deux techniques spectrométriques à l'étude épidémiologique des isolats de *B. pertussis*.

- **SM-MT.** La capacité de la SM-MT à différencier les espèces est aujourd'hui plébiscitée par son usage généralisé en microbiologie médicale, à l'aide de systèmes informatisés conçus pour le diagnostic *in vitro*. Plus récemment, des travaux ont montré l'intérêt de la technique pour différencier des isolats au sein d'une même espèce (Murray, 2010) (Månsson *et al.*, 2018) (Rahi & Vaishampayan, 2020). Il s'agit cependant dans la plupart des cas d'utilisation d'équipement de SM-MT dont les réglages analytiques ne sont pas ceux de la routine diagnostique (Rothen *et al.*, 2020), excluant son utilisation hors du cadre de la recherche. Un outil d'investigation épidémiologique étant néanmoins fourni par le fabricant depuis 2019, nous l'avons testé sur nos isolats. Nous avons malheureusement constaté que nos isolats présentaient trop peu de variations spectrales pour être différenciés. Cependant, la méthode permettait de façon reproductible de séparer très clairement la souche historique de *B. pertussis* que nous avons incluse comme contrôle. Ce résultat suggère que, (i) on ne peut exclure une proximité phylogénétique des isolats de l'étude, en raison notamment de leur origine géographique et temporelle commune, (ii) comme supposé depuis longtemps (Caro *et al.*, 2008), les souches historiques de référence (et plus 60 ans de subculture) sont très différentes des isolats circulants, (iii) en affinant la technique d'analyse, par sélection de pics spectrométriques particuliers par exemple, l'approche épidémiologique SM-MT pourrait tout de même avoir un intérêt de typage rapide dans le contexte de la coqueluche.

- **IR-TF.** À notre connaissance, cette technique n'avait jamais encore été appliquée à l'épidémiologie de la coqueluche, bien qu'il existe une littérature assez abondante sur l'utilisation en recherche de l'IR-TF pour analyser la composition des polysaccharides produits par *B. pertussis*, principalement dans le domaine des biofilms que la bactérie est capable de former (Bosch *et al.*, 2006) (Serra *et al.*, 2008) (Cattelan *et al.*, 2017).

Par cette méthode de typage bien plus éprouvée que la SM-MT (Martak *et al.*, 2019) (Burckhardt *et al.*, 2019) (Hu *et al.*, 2020) nous avons observé une faible diversité de 22 des 23 isolats de l'étude, renforçant l'hypothèse d'une étroite proximité phylogénétique. L'isolat 1138 était à l'inverse individualisé sans ambiguïté y compris en imposant une valeur seuil d'interprétation basse (< 0.16 , Fig. 20), et sa distance évolutive au groupe principal était même plus grande que celle de la souche historique CIP 63.1 - ATCC 9797. S'agissant du plus ancien isolat de notre travail (novembre 2017), son génotypage et celui d'au moins un isolat plus récent du groupe principal devrait permettre de confirmer ce résultat.

La présence d'amidon dans le milieu de culture n'a apparemment pas affecté l'analyse. Il serait toutefois intéressant de comparer les résultats obtenus à partir de colonies sur gélose de Regan-Lowe (*i.e.*, sans amidon) afin de mettre en évidence une éventuelle interférence de la présence du polysaccharide dans l'absorbance entre 1 300 et 800 cm^{-1} .

Nous ne pouvons encore à ce stade valider l'outil épidémiologique IR-TF pour *B. pertussis*, faute de connaître le degré de diversité génomique des isolats cliniques de l'étude, mais la dissemblance entre le *cluster* principal de nos isolats et la souche historique de référence d'une part, l'isolat 1138 d'autre part, nous incite à penser que les différences notables peuvent être mises en évidence par cette technique simple et peu coûteuse.

Il nous semble donc important de poursuivre l'évaluation SM-MT et surtout IR-TF en y adjoignant des isolats d'origine géographique variée, en particulier asiatiques. Leurs caractéristiques phénotypiques (*e.g.*, résistance aux macrolides) et génotypiques (*e.g.*, *ptxP*) semblent en effet différentes (Li *et al.*, 2019) (Yao *et al.*, 2020) de celles des isolats européens, et la différenciation en SM-MT et en IR-TF pourraient être possible à l'instar de ce que nous avons observé avec la souche historique CIP 63.1 - ATCC 9797 et l'isolat 1138 de l'étude. Néanmoins, l'obtention de données génomique fiables (*whole genome sequencing*, WGS ou, *a minima*, typage *multilocus* MLST ou r-MLST) sera cruciale pour valider ces deux méthodes.

Enfin, notre travail gagnerait à être complété par une approche qui sort malheureusement du contexte de la routine diagnostique, qui est l'étude de l'expression des principaux facteurs de virulence des isolats recueillis. Nous pourrions ainsi évaluer leur diversité par rapport à ceux des souches historiques et contemporaines, et surtout leur adéquation avec la composition des vaccins disponibles. Des données de séquençage génomique ou plus simplement de PCR/séquençage pour chacun d'entre eux sont requises dans cette perspective, avant d'envisager des approches immunologiques de type *Western blot* par exemple.

Conclusion

Comme toute maladie infectieuse épidémique pouvant être prévenue par la vaccination, la coqueluche nous confronte à deux impératifs interdépendants : disposer (i) de diagnostics rapides, sensibles et spécifiques, (ii) de moyens de surveillance de l'agent infectieux pour détecter ses variations de virulence, d'immunogénicité et de réponse au traitement.

En 2021, l'objectif diagnostique est atteint, au moins dans la phase aiguë de l'infection, par des tests PCR sensibles et spécifiques. En revanche, quelle que soit l'approche envisagée pour satisfaire au second impératif, il reste indispensable de disposer d'échantillons bactériens vivants représentatifs des souches circulantes de *B. pertussis*.

Nous souhaitons donc que ce travail puisse contribuer à un regain d'intérêt pour la culture de cet important pathogène dans les laboratoires de bactériologie médicale. La validation et l'affinement de techniques de typage rapides et faciles à mettre en œuvre comme la SM-MT ou l'IR-TF permettraient ensuite de limiter et simplifier les confirmations génomiques et les analyses d'expression des facteurs de virulence et/ou d'immunogénicité.

La prise en charge et la prévention de la coqueluche ainsi que l'évaluation de l'efficacité des vaccins actuels et à venir en bénéficieraient à coup sûr.

Références bibliographiques

- Andreasen, C., and Carbonetti, N.H. (2008). Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to *Bordetella pertussis* respiratory tract infection in mice. *Infect. Immun.* 76, 5139–5148.
- Aricò, B., and Rappuoli, R. (1987). *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J. Bacteriol.* 169, 2847–2853.
- Aslanabadi, A., Ghabili, K., Shad, K., Khalili, M., and Sajadi, M.M. (2015). Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia. *Lancet Infect Dis* 15, 1480–1484.
- avis HCSP (2014). [Haut Conseil de la santé publique (HCSP). Management of single or multiple pertussis cases]. *Rev Mal Respir* 32, 639–656.
- Baraff, L.J., Ablon, W.J., and Weiss, R.C. (1983). Possible temporal association between diphtheria-tetanus toxoid-pertussis vaccination and sudden infant death syndrome. *Pediatr Infect Dis* 2, 7–11.
- Barkoff, A.-M., Mertsola, J., Pierard, D., Dalby, T., Hoegh, S.V., Guillot, S., Stefanelli, P., van Gent, M., Berbers, G., Vestrheim, D., *et al.* (2019). Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. *Euro Surveill* 24.
- Bart, M.J., van Gent, M., van der Heide, H.G.J., Boekhorst, J., Hermans, P., Parkhill, J., and Mooi, F.R. (2010). Comparative genomics of prevaccination and modern *Bordetella pertussis* strains. *BMC Genomics* 11, 627.
- Bart, M.J., Harris, S.R., Advani, A., Arakawa, Y., Bottero, D., Bouchez, V., Cassidy, P.K., Chiang, C.-S., Dalby, T., Fry, N.K., *et al.* (2014). Global Population Structure and Evolution of *Bordetella pertussis* and Their Relationship with Vaccination. *MBio* 5.
- Bassinat, L., Gueirard, P., Maitre, B., Housset, B., Gounon, P., and Guiso, N. (2000). Role of Adhesins and Toxins in Invasion of Human Tracheal Epithelial Cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 68, 1934–1941.
- Beach, N.M., Thompson, S., Mutnick, R., Brown, L., Kettig, G., Puffenbarger, R., Miyamoto, D., and Temple, L. (2012). *Bordetella avium* Antibiotic Resistance, Novel Enrichment Culture, and Antigenic Characterization. *Vet Microbiol* 160, 189–196.
- Berg, J.M. (1958). Neurological complications of pertussis immunization. *Br Med J* 2, 24–27.
- Bergquist, S.O., Bernander, S., Dahnsjö, H., and Sundelöf, B. (1987). Erythromycin in the treatment of pertussis: a study of bacteriologic and clinical effects. *Pediatr Infect Dis J* 6, 458–461.
- Bordet, J., and Gengou, O. (1906). Bordet, J., and Gengou, O., Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur*, 1906 ; 20 : 731.

- Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann, D., and Yantorno, O. (2006). Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 736–747.
- Bouchez, V., and Guiso, N. (2015). *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, vaccines and cycles of whooping cough. *Pathog Dis* 73.
- Bouchez, V., Brun, D., Cantinelli, T., Dore, G., Njamkepo, E., and Guiso, N. (2009). First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* 27, 6034–6041.
- Bouchez, V., Guglielmini, J., Dazas, M., Landier, A., Toubiana, J., Guillot, S., Criscuolo, A., and Brisse, S. (2018). Genomic Sequencing of *Bordetella pertussis* for Epidemiology and Global Surveillance of Whooping Cough. *Emerging Infect. Dis.* 24, 988–994.
- Bowden, K.E., Weigand, M.R., Peng, Y., Cassiday, P.K., Sammons, S., Knipe, K., Rowe, L.A., Loparev, V., Sheth, M., Weening, K., *et al.* (2016). Genome Structural Diversity among 31 *Bordetella pertussis* Isolates from Two Recent U.S. Whooping Cough Statewide Epidemics. *MSphere* 1.
- Brennan, M., Strebel, P., George, H., Yih, W.K., Tachdjian, R., Lett, S.M., Cassiday, P., Sanden, G., and Wharton, M. (2000). Evidence for transmission of pertussis in schools, Massachusetts, 1996: epidemiologic data supported by pulsed-field gel electrophoresis studies. *J Infect Dis* 181, 210–215.
- Broutin, H., Viboud, C., Grenfell, B.T., Miller, M.A., and Rohani, P. (2010). Impact of vaccination and birth rate on the epidemiology of pertussis: a comparative study in 64 countries. *Proc Biol Sci* 277, 3239–3245.
- Burckhardt, I., Sebastian, K., Mauder, N., Kostrzewa, M., Burckhardt, F., and Zimmermann, S. (2019). Analysis of *Streptococcus pneumoniae* using Fourier-transformed infrared spectroscopy allows prediction of capsular serotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38, 1883–1890.
- Byers, R.K., and Moll, F.C. (1948). Encephalopathies following prophylactic pertussis vaccine. *Pediatrics* 1, 437–457.
- Carbonetti, N.H. (2015). Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog Dis* 73, ftv073.
- Carbonetti, N.H., Artamonova, G.V., Mays, R.M., and Worthington, Z.E.V. (2003). Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 71, 6358–6366.
- Carbonetti, N.H., Artamonova, G.V., Andreasen, C., Dudley, E., Mays, R.M., and Worthington, Z.E.V. (2004). Suppression of Serum Antibody Responses by Pertussis Toxin after Respiratory Tract Colonization by *Bordetella pertussis* and Identification of an Immunodominant Lipoprotein. *Infect Immun* 72, 3350–3358.
- Caro, V., Bouchez, V., and Guiso, N. (2008). Is the Sequenced *Bordetella pertussis* strain Tohama I representative of the species? *J Clin Microbiol* 46, 2125–2128.
- Cattelan, N., Dubey, P., Arnal, L., Yantorno, O.M., and Deora, R. (2016). *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog Dis* 74, ftv108.

- Cattelan, N., Jennings-Gee, J., Dubey, P., Yantorno, O.M., and Deora, R. (2017). Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect. Immun.* *85*.
- Cavaillon, J., Sansonetti, P., and Goldman, M. (2020). Jules Bordet, a man of conviction. Centenary of his Nobel Prize. *Medecine Sciences : M/S* *36*.
- Cherry, J.D. (1984). The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study. *Curr Probl Pediatr* *14*, 1–78.
- Cherry, J.D. (2018). Treatment of Pertussis-2017. *J Pediatric Infect Dis Soc* *7*, e123–e125.
- Cherry, J.D., Gornbein, J., Heininger, U., and Stehr, K. (1998). A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* *16*, 1901–1906.
- Cherry, J.D., Grimprel, E., Guiso, N., Heininger, U., and Mertsola, J. (2005). Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J* *24*, S25-34.
- Cornia, P.B., Hersh, A.L., Lipsky, B.A., Newman, T.B., and Gonzales, R. (2010). Does this coughing adolescent or adult patient have pertussis? *JAMA* *304*, 890–896.
- Crowcroft, N.S., Booy, R., Harrison, T., Spicer, L., Britto, J., Mok, Q., Heath, P., Murdoch, I., Zambon, M., George, R., *et al.* (2003a). Severe and unrecognised: pertussis in UK infants. *Arch Dis Child* *88*, 802–806.
- Crowcroft, N.S., Stein, C., Duclos, P., and Birmingham, M. (2003b). How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis* *3*, 413–418.
- Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman, D.A., and Miller, J.F. (2006). Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella BvgAS*. *J Bacteriol* *188*, 1775–1785.
- Cundell, D.R., Kanthakumar, K., Taylor, G.W., Goldman, W.E., Flak, T., Cole, P.J., and Wilson, R. (1994). Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infect Immun* *62*, 639–643.
- Dalby, T., Petersen, J.W., Harboe, Z.B., and Krogfelt, K.A. (2010). Antibody responses to pertussis toxin display different kinetics after clinical *Bordetella pertussis* infection than after vaccination with an acellular pertussis vaccine. *J Med Microbiol* *59*, 1029–1036.
- Decker, K.B., James, T.D., Stibitz, S., and Hinton, D.M. (2012). The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiology*, *158*, 1665–1676.
- Decker, M.D., Edwards, K.M., Steinhoff, M.C., Rennels, M.B., Pichichero, M.E., Englund, J.A., Anderson, E.L., Deloria, M.A., and Reed, G.F. (1995). Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics* *96*, 557–566.
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., Schouls, L.M., Brinig, M.M., Relman, D.A., and Mooi, F.R. (2005a). *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping

- Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog* 1.
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., Schouls, L.M., Brinig, M.M., Relman, D.A., and Mooi, F.R. (2005b). *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog* 1.
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., van der Heide, H.G.J., van Gent, M., Liew, S., Relman, D.A., and Mooi, F.R. (2006). Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* genomes. *J Bacteriol* 188, 8385–8394.
- DI, C., and Jw, E. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase (*Science*).
- Donoso, A., León, J., Ramírez, M., Rojas, G., and Oberpaur, B. (2005). Pertussis and fatal pulmonary hypertension: a discouraged entity. *Scand J Infect Dis* 37, 145–148.
- Ducours, M., Rispal, P., Danjean, M.P., Imbert, Y., Dupont, E., Traissac, E.M., and Grosleron, S. (2017). *Bordetella bronchiseptica* infection. *Med Mal Infect* 47, 453–458.
- Edelman, K., He, Q., Mäkinen, J., Sahlberg, A., Haanperä, M., Schuerman, L., Wolter, J., and Mertsola, J. (2007). Immunity to pertussis 5 years after booster immunization during adolescence. *Clin Infect Dis* 44, 1271–1277.
- Elliott, E., McIntyre, P., Ridley, G., Morris, A., Massie, J., McEniery, J., and Knight, G. (2004). National study of infants hospitalized with pertussis in the acellular vaccine era. *Pediatr Infect Dis J* 23, 246–252.
- Farizo, K.M., Cochi, S.L., Zell, E.R., Brink, E.W., Wassilak, S.G., and Patriarca, P.A. (1992). Epidemiological features of pertussis in the United States, 1980-1989. *Clin Infect Dis* 14, 708–719.
- Farrell, D.J., Daggard, G., and Mukkur, T.K.S. (1999). Nested Duplex PCR To Detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and Its Application in Diagnosis of Pertussis in Nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia. *J Clin Microbiol* 37, 606–610.
- Flak, T.A., and Goldman, W.E. (1999). Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* 1, 51–60.
- Forsyth, K., Tan, T., von König, C.-H.W., Caro, J.J., and Plotkin, S. (2005). Potential strategies to reduce the burden of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 24, S69-74.
- Fullen, A.R., Yount, K.S., Dubey, P., and Deora, R. (2020). Whoop! There it is: The surprising resurgence of pertussis. *PLoS Pathog* 16.
- Funaki, T., and Miyairi, I. (2015). Lymphocytosis in a baby with pertussis. *Lancet Infect Dis* 15, 130.

- Garbal, M., Adaszek, Ł., Łyp, P., Frymus, J., Winiarczyk, M., and Winiarczyk, S. (2016). Occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in domestic cats with upper respiratory tract infections. *Pol J Vet Sci* 19, 353–358.
- Geuijen, C.A., Willems, R.J., and Mooi, F.R. (1996). The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* 64, 2657–2665.
- Geuijen, C.A., Willems, R.J., Bongaerts, M., Top, J., Gielen, H., and Mooi, F.R. (1997). Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect. Immun.* 65, 4222–4228.
- Gilberg, S., Njamkepo, E., Du Châtelet, I.P., Partouche, H., Gueirard, P., Ghasarossian, C., Schlumberger, M., and Guiso, N. (2002). Evidence of *Bordetella pertussis* infection in adults presenting with persistent cough in a french area with very high whole-cell vaccine coverage. *J Infect Dis* 186, 415–418.
- de Gouw, D., Hermans, P.W.M., Bootsma, H.J., Zomer, A., Heuvelman, K., Diavatopoulos, D.A., and Mooi, F.R. (2014). Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One* 9, e84523.
- Granström, G., Sterner, G., Nord, C.E., and Granström, M. (1987). Use of erythromycin to prevent pertussis in newborns of mothers with pertussis. *J Infect Dis* 155, 1210–1214.
- de Greeff, S.C., Mooi, F.R., Westerhof, A., Verbakel, J.M.M., Peeters, M.F., Heuvelman, C.J., Notermans, D.W., Elvers, L.H., Schellekens, J.F.P., and de Melker, H.E. (2010). Pertussis disease burden in the household: how to protect young infants. *Clin Infect Dis* 50, 1339–1345.
- Grimprel, E., Bégué, P., Anjak, I., Betsou, F., and Guiso, N. (1993). Comparison of polymerase chain reaction, culture, and western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* 31, 2745–2750.
- Grimprel, E., Bégué, P., Anjak, I., Njamkepo, E., François, P., and Guiso, N. (1996). Long-term human serum antibody responses after immunization with whole-cell pertussis vaccine in France. *Clin Diagn Lab Immunol* 3, 93–97.
- Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M., and Guiso, N. (1998). Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin in Alveolar Macrophage Apoptosis during *Bordetella pertussis* Infection In Vivo. *Infect Immun* 66, 1718–1725.
- Guiso, N. (2006). Histoire de la coqueluche. *Médecine Thérapeutique / Pédiatrie* 9, 135–137.
- Guiso, N., de La Rocque, F., Njamkepo, E., Lécuyer, A., Levy, C., Romain, O., Thollot, F., Abitbol, V., Soubeyrand, B., Cohen, R., *et al.* (2008). Pertussis surveillance in private pediatric practices, France, 2002-2006. *Emerg Infect Dis* 14, 1159–1161.
- Guiso, N., Levy, C., Romain, O., Guillot, S., Werner, A., Rondeau, M.C., Béchet, S., and Cohen, R. (2017). Whooping cough surveillance in France in pediatric private practice in 2006-2015. *Vaccine* 35, 6083–6088.

- Hallander, H.O., Reizenstein, E., Renemar, B., Rasmuson, G., Mardin, L., and Olin, P. (1993). Comparison of nasopharyngeal aspirates with swabs for culture of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 31, 50–52.
- Halperin, S.A., Bortolussi, R., and Wort, A.J. (1989). Evaluation of culture, immunofluorescence, and serology for the diagnosis of pertussis. *J Clin Microbiol* 27, 752–757.
- Halperin, S.A., Bortolussi, R., Langley, J.M., Eastwood, B.J., and De Serres, G. (1999). A randomized, placebo-controlled trial of erythromycin estolate chemoprophylaxis for household contacts of children with culture-positive *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics* 104, e42.
- Hegerle, N., and Guiso, N. (2013). Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. *Future Microbiol* 8, 1391–1403.
- Heininger, U., Cherry, J.D., Eckhardt, T., Lorenz, C., Christenson, P., and Stehr, K. (1993). Clinical and laboratory diagnosis of pertussis in the regions of a large vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr Infect Dis J* 12, 504–509.
- Heininger, U., Cherry, J.D., Stehr, K., Schmitt-Grohé, S., Uberall, M., Laussucq, S., Eckhardt, T., Meyer, M., and Gornbein, J. (1998). Comparative Efficacy of the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine and Lederle whole-cell component DTP vaccine in German children after household exposure. Pertussis Vaccine Study Group. *Pediatrics* 102, 546–553.
- Heininger, U., Cherry, J.D., and Stehr, K. (2004). Serologic response and antibody-titer decay in adults with pertussis. *Clin Infect Dis* 38, 591–594.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 692–744.
- Henderson, M.W., Inatsuka, C.S., Sheets, A.J., Williams, C.L., Benaron, D.J., Donato, G.M., Gray, M.C., Hewlett, E.L., and Cotter, P.A. (2012). Contribution of *Bordetella filamentous* hemagglutinin and adenylate cyclase toxin to suppression and evasion of interleukin-17-mediated inflammation. *Infect. Immun.* 80, 2061–2075.
- Herrou, J., Debrie, A.-S., Willery, E., Renaud-Mongénie, G., Locht, C., Mooi, F., Jacob-Dubuisson, F., and Antoine, R. (2009). Molecular Evolution of the Two-Component System BvgAS Involved in Virulence Regulation in *Bordetella*. *PLoS One* 4.
- Hewitt, M., and Canning, B.J. (2010). Coughing precipitated by *Bordetella pertussis* infection. *Lung* 188 Suppl 1, S73-79.
- Hewlett, E.L., and Edwards, K.M. (2005). Clinical practice. Pertussis--not just for kids. *N Engl J Med* 352, 1215–1222.
- Hijnen, M., Mooi, F.R., van Gageldonk, P.G.M., Hoogerhout, P., King, A.J., and Berbers, G.A.M. (2004). Epitope Structure of the *Bordetella pertussis* Protein P.69 Pertactin, a Major Vaccine Component and Protective Antigen. *Infect Immun* 72, 3716–3723.

- Hoo, R., Lam, J.H., Huot, L., Pant, A., Li, R., Hot, D., and Alonso, S. (2014). Evidence for a Role of the Polysaccharide Capsule Transport Proteins in Pertussis Pathogenesis. *PLoS One* 9.
- Hoppe, J.E. (1988). Methods for isolation of *Bordetella pertussis* from patients with whooping cough. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7, 616–620.
- Horiguchi, Y., Inoue, N., Masuda, M., Kashimoto, T., Katahira, J., Sugimoto, N., and Matsuda, M. (1997). *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11623–11626.
- Hot, D., Antoine, R., Renauld-Mongénie, G., Caro, V., Hennuy, B., Levillain, E., Huot, L., Wittmann, G., Poncet, D., Jacob-Dubuisson, F., *et al.* (2003). Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics* 269, 475–486.
- Hovingh, E.S., Mariman, R., Solans, L., Hijdra, D., Hamstra, H.-J., Jongerius, I., van Gent, M., Mooi, F., Locht, C., and Pinelli, E. (2018). *Bordetella pertussis* pertactin knock-out strains reveal immunomodulatory properties of this virulence factor. *Emerg Microbes Infect* 7.
- Hu, Y., Zhou, H., Lu, J., Sun, Q., Liu, C., Zeng, Y., and Zhang, R. (2020). Evaluation of the IR Biotyper for *Klebsiella pneumoniae* typing and its potentials in hospital hygiene management. *Microb Biotechnol*.
- Inatsuka, C.S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J.F., and Cotter, P.A. (2010). Pertactin Is Required for *Bordetella* Species To Resist Neutrophil-Mediated Clearance. *Infect Immun* 78, 2901–2909.
- Katzko, G., Hofmeister, M., and Church, D. (1996). Extended incubation of culture plates improves recovery of *Bordetella* spp. *J Clin Microbiol* 34, 1563–1564.
- Kerr, J.R., and Matthews, R.C. (2000). *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 77–88.
- Kilgore, P.E., Salim, A.M., Zervos, M.J., and Schmitt, H.-J. (2016). Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev* 29, 449–486.
- Klein, N.P. (2014). Licensed pertussis vaccines in the United States. *Hum Vaccin Immunother* 10, 2684–2690.
- Klein, N.P., Bartlett, J., Rowhani-Rahbar, A., Fireman, B., and Baxter, R. (2012). Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. *N Engl J Med* 367, 1012–1019.
- von König, C.-H.W. (2005). Use of antibiotics in the prevention and treatment of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 24, S66-68.
- Kösters, K., Riffelmann, M., and VON König, C.H.W. (2001). Evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* in clinical samples. *J Med Microbiol* 50, 436–440.

- Kotob, S.I., Hausman, S.Z., and Burns, D.L. (1995). Localization of the promoter for the *ptl* genes of *Bordetella pertussis*, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin. *Infect. Immun.* *63*, 3227–3230.
- Kowalzik, F., Barbosa, A.P., Fernandes, V.R., Carvalho, P.R., Avila-Aguero, M.L., Goh, D.Y.T., Goh, A., de Miguel, J.G., Moraga, F., Roca, J., *et al.* (2007). Prospective multinational study of pertussis infection in hospitalized infants and their household contacts. *Pediatr Infect Dis J* *26*, 238–242.
- Kurova, N., Njamkepo, E., Brun, D., Tseneva, G., and Guiso, N. (2010). Monitoring of *Bordetella* isolates circulating in Saint Petersburg, Russia between 2001 and 2009. *Res Microbiol* *161*, 810–815.
- Lam, C., Octavia, S., Bahrame, Z., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., and Lan, R. (2012). Selection and emergence of pertussis toxin promoter *ptxP3* allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infect Genet Evol* *12*, 492–495.
- Le, T., Cherry, J.D., Chang, S.-J., Knoll, M.D., Lee, M.L., Barenkamp, S., Bernstein, D., Edelman, R., Edwards, K.M., Greenberg, D., *et al.* (2004). Immune responses and antibody decay after immunization of adolescents and adults with an acellular pertussis vaccine: the APERT Study. *J Infect Dis* *190*, 535–544.
- Lesne, E., Cavell, B.E., Freire-Martin, I., Persaud, R., Alexander, F., Taylor, S., Matheson, M., van Els, C.A.C.M., and Gorryng, A. (2020). Acellular Pertussis Vaccines Induce Anti-pertactin Bactericidal Antibodies Which Drives the Emergence of Pertactin-Negative Strains. *Front Microbiol* *11*, 2108.
- Li, L., Deng, J., Ma, X., Zhou, K., Meng, Q., Yuan, L., Shi, W., Wang, Q., Li, Y., and Yao, K. (2019). High Prevalence of Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* and *ptxP1* Genotype, Mainland China, 2014–2016. *Emerg Infect Dis* *25*, 2205–2214.
- Lind-Brandberg, L., Welinder-Olsson, C., Lagergård, T., Taranger, J., Trollfors, B., and Zackrisson, G. (1998). Evaluation of PCR for Diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* Infections. *J Clin Microbiol* *36*, 679–683.
- Linz, B., Ivanov, Y.V., Preston, A., Brinkac, L., Parkhill, J., Kim, M., Harris, S.R., Goodfield, L.L., Fry, N.K., Gorryng, A.R., *et al.* (2016). Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. *BMC Genomics* *17*, 767.
- Locht, C. (1999). Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *Int. Microbiol.* *2*, 137–144.
- Locht, C., and Mielcarek, N. (2012). New pertussis vaccination approaches: en route to protect newborns? *FEMS Immunol Med Microbiol* *66*, 121–133.
- Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F.D., and Renaud, G. (1993). The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol. Microbiol.* *9*, 653–660.
- Locht, C., Antoine, R., and Jacob-Dubuisson, F. (2001). *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* *4*, 82–89.
- Locht, C., Coutte, L., and Mielcarek, N. (2011). The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J.* *278*, 4668–4682.

- Loker, S.B., Temple, L.M., and Preston, A. (2011). The *Bordetella avium* BAV1965-1962 fimbrial locus is regulated by temperature and produces fimbriae involved in adherence to turkey tracheal tissue. *Infect. Immun.* **79**, 2423–2429.
- Månsson, V., Gilsdorf, J.R., Kahlmeter, G., Kilian, M., Kroll, J.S., Riesbeck, K., and Resman, F. (2018). Capsule Typing of *Haemophilus influenzae* by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Emerg Infect Dis* **24**, 443–452.
- Martak, D., Valot, B., Sauget, M., Cholley, P., Thouverez, M., Bertrand, X., and Hocquet, D. (2019). Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks. *Front Microbiol* **10**.
- Martini, H., Detemmerman, L., Soetens, O., Yusuf, E., and Piérard, D. (2017). Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four target real-time PCR. *PLoS One* **12**.
- Martino, A., Volpe, E., Auricchio, G., Colizzi, V., and Baldini, P.M. (2006). Influence of pertussis toxin on CD1a isoform expression in human dendritic cells. *J Clin Immunol* **26**, 153–159.
- Mattoo, S., and Cherry, J.D. (2005). Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**, 326–382.
- Mattoo, S., Miller, J.F., and Cotter, P.A. (2000). Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect. Immun.* **68**, 2024–2033.
- McLafferty, M.A., Harcus, D.R., and Hewlett, E.L. (1988). Nucleotide sequence and characterization of a repetitive DNA element from the genome of *Bordetella pertussis* with characteristics of an insertion sequence. *J Gen Microbiol* **134**, 2297–2306.
- Mertsola, J., Ruuskanen, O., Kuronen, T., Meurman, O., and Viljanen, M.K. (1990). Serologic diagnosis of pertussis: evaluation of pertussis toxin and other antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* **161**, 966–971.
- Mooi, F.R. (2010). *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect Genet Evol* **10**, 36–49.
- Mooi, F.R., van der Heide, H.G., ter Avest, A.R., Welinder, K.G., Livey, I., van der Zeijst, B.A., and Gastra, W. (1987). Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species. *Microb. Pathog.* **2**, 473–484.
- Mooi, F.R., Hallander, H., Wirsing von König, C.H., Hoet, B., and Guiso, N. (2000). Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 174–181.
- Mooi, F.R., van Loo, I.H.M., van Gent, M., He, Q., Bart, M.J., Heuvelman, K.J., de Greeff, S.C., Diavatopoulos, D., Teunis, P., Nagelkerke, N., *et al.* (2009). *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* **15**, 1206–1213.

- Mooi, F.R., Van Der Maas, N. a. T., and De Melker, H.E. (2014). Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* 142, 685–694.
- Moon, K., Bonocora, R.P., Kim, D.D., Chen, Q., Wade, J.T., Stibitz, S., and Hinton, D.M. (2017). The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *MBio* 8.
- Mortimer, E.A., Jones, P.K., and Adelson, L. (1983). DTP and SIDS. *Pediatr Infect Dis* 2, 492–493.
- Mu, H.H., Cooley, M.A., and Sewell, W.A. (1994). Studies on the lymphocytosis induced by pertussis toxin. *Immunol. Cell Biol.* 72, 267–270.
- Müller, F.M., Hoppe, J.E., and Wirsing von König, C.H. (1997). Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J Clin Microbiol* 35, 2435–2443.
- Murray, P.R. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 16, 1626–1630.
- Murray, E.L., Nieves, D., Bradley, J.S., Gargas, J., Mason, W.H., Lehman, D., Harriman, K., and Cherry, J.D. (2013). Characteristics of Severe *Bordetella pertussis* Infection Among Infants ≤90 Days of Age Admitted to Pediatric Intensive Care Units - Southern California, September 2009-June 2011. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2, 1–6.
- Nakamura, Y., Kamachi, K., Toyozumi-Ajisaka, H., Otsuka, N., Saito, R., Tsuruoka, J., Katsuta, T., Nakajima, N., Okada, K., Kato, T., *et al.* (2011). Marked difference between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. *Clin Microbiol Infect* 17, 365–370.
- Nieves, D.J., and Heininger, U. (2016). *Bordetella pertussis*. *Microbiol Spectr* 4.
- Novotny, P., Chubb, A.P., Cownley, K., and Charles, I.G. (1991). Biologic and protective properties of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*: a novel formulation for an acellular pertussis vaccine. *J Infect Dis* 164, 114–122.
- Otsuka, N., Han, H.-J., Toyozumi-Ajisaka, H., Nakamura, Y., Arakawa, Y., Shibayama, K., and Kamachi, K. (2012). Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One* 7, e31985.
- Paisley, R.D., Blaylock, J., and Hartzell, J.D. (2012). Whooping cough in adults: an update on a reemerging infection. *Am J Med* 125, 141–143.
- Park, J., Zhang, Y., Buboltz, A.M., Zhang, X., Schuster, S.C., Ahuja, U., Liu, M., Miller, J.F., Sebahia, M., Bentley, S.D., *et al.* (2012). Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC Genomics* 13, 545.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., *et al.* (2003a). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 35, 32–40.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., *et al.* (2003b).

- Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* 35, 32–40.
- Pawloski, L.C., Kirkland, K.B., Baughman, A.L., Martin, M.D., Talbot, E.A., Messonnier, N.E., and Tondella, M.L. (2012). Does tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccination interfere with serodiagnosis of pertussis infection? *Clin Vaccine Immunol* 19, 875–880.
- Pawloski, L.C., Queenan, A.M., Cassidy, P.K., Lynch, A.S., Harrison, M.J., Shang, W., Williams, M.M., Bowden, K.E., Burgos-Rivera, B., Qin, X., *et al.* (2014). Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 119–125.
- Pierce, C., Klein, N., and Peters, M. (2000). Is leukocytosis a predictor of mortality in severe pertussis infection? *Intensive Care Med* 26, 1512–1514.
- Pittet, L.F., Emonet, S., Schrenzel, J., Siegrist, C.-A., and Posfay-Barbe, K.M. (2014). *Bordetella holmesii*: an under-recognised *Bordetella* species. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 510–519.
- Porter, J.F., Parton, R., and Wardlaw, A.C. (1991). Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl Environ Microbiol* 57, 1202–1206.
- Rahi, P., and Vaishampayan, P. (2020). Editorial: MALDI-TOF MS Application in Microbial Ecology Studies. *Front Microbiol* 10, 2954.
- Raymond, J., Armengaud, J.-B., Cosnes-Lambe, C., Chalumeau, M., Bosdure, E., Reglier-Poupet, H., El Hajje, M.-J., Iniguez, J.-L., Moulin, F., Poyart, C., *et al.* (2007). Pertussis in young infants: apnoea and intra-familial infection. *Clinical Microbiology and Infection* 13, 172–175.
- Regan, J., and Lowe, F. (1977). Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol* 6, 303–309.
- Reizenstein, E., Johansson, B., Mardin, L., Abens, J., Möllby, R., and Hallander, H.O. (1993). Diagnostic evaluation of polymerase chain reaction discriminative for *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 17, 185–191.
- Riffelmann, M., Wirsing von König, C.H., Caro, V., and Guiso, N. (2005). Nucleic Acid Amplification Tests for Diagnosis of *Bordetella* Infections. *J Clin Microbiol* 43, 4925–4929.
- Rodman, A.C., Bradford, W.L., and Berry, G.P. (1946). An Epidemiological Study of an Outbreak of Pertussis in a Public School. *Am J Public Health Nations Health* 36, 1156–1162.
- Roorda, L., Buitenwerf, J., Ossewaarde, J.M., and van der Zee, A. (2011). A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements. *BMC Res Notes* 4, 11.

- Rosenthal, R.S., Nogami, W., Cookson, B.T., Goldman, W.E., and Folkening, W.J. (1987). Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect Immun* *55*, 2117–2120.
- Rothen, J., Sapugahawatte, D.N., Li, C., Lo, N., Vogel, G., Foucault, F., Pflüger, V., Pothier, J.F., Blom, J., Daubenberger, C., *et al.* (2020). A simple, rapid typing method for *Streptococcus agalactiae* based on ribosomal subunit proteins by MALDI-TOF MS. *Sci Rep* *10*, 8788.
- Safarchi, A., Octavia, S., Wu, S.Z., Kaur, S., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., Wood, N., McIntyre, P., Marshall, H., Keil, A.D., *et al.* (2016). Genomic dissection of Australian *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2012 epidemic. *J Infect* *72*, 468–477.
- Sawal, M., Cohen, M., Irazuzta, J.E., Kumar, R., Kirton, C., Brundler, M.-A., Evans, C.A., Wilson, J.A., Raffeeq, P., Azaz, A., *et al.* (2009). Fulminant pertussis: a multi-center study with new insights into the clinico-pathological mechanisms. *Pediatr Pulmonol* *44*, 970–980.
- Scanlon, K., Skerry, C., and Carbonetti, N. (2019). ROLE OF MAJOR TOXIN VIRULENCE FACTORS IN PERTUSSIS INFECTION AND DISEASE PATHOGENESIS. *Adv Exp Med Biol* *1183*, 35–51.
- Scheller, E.V., and Cotter, P.A. (2015). *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis* *73*.
- Schmidt-Schläpfer, G., Liese, J.G., Porter, F., Stojanov, S., Just, M., and Belohradsky, B.H. (1997). Polymerase chain reaction (PCR) compared with conventional identification in culture for detection of *Bordetella pertussis* in 7153 children. *Clin Microbiol Infect* *3*, 462–467.
- Schmitt-Grohé, S., Cherry, J.D., Heininger, U., Uberall, M.A., Pineda, E., and Stehr, K. (1995). Pertussis in German adults. *Clin Infect Dis* *21*, 860–866.
- Sealey, K.L., Harris, S.R., Fry, N.K., Hurst, L.D., Gorringer, A.R., Parkhill, J., and Preston, A. (2015). Genomic analysis of isolates from the United Kingdom 2012 pertussis outbreak reveals that vaccine antigen genes are unusually fast evolving. *J Infect Dis* *212*, 294–301.
- Serra, D.O., Lücking, G., Weiland, F., Schulz, S., Görg, A., Yantorno, O.M., and Ehling-Schulz, M. (2008). Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *PROTEOMICS* *8*, 4995–5010.
- Sheridan, S.L., Frith, K., Snelling, T.L., Grimwood, K., McIntyre, P.B., and Lambert, S.B. (2014). Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. *Expert Rev Vaccines* *13*, 1081–1106.
- Smith, C., and Vyas, H. (2000). Early infantile pertussis; increasingly prevalent and potentially fatal. *Eur J Pediatr* *159*, 898–900.
- Stehr, K., Cherry, J.D., Heininger, U., Schmitt-Grohé, S., Uberall, M., Laussucq, S., Eckhardt, T., Meyer, M., Engelhardt, R., and Christenson, P. (1998). A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/Takeda acellular

pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP vaccine, or DT vaccine. *Pediatrics* 101, 1–11.

Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H., and Read, R.J. (1994a). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 2, 45–57.

Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Heerze, L.D., Cockle, S.A., Klein, M.H., and Read, R.J. (1994b). Structure of a pertussis toxin-sugar complex as a model for receptor binding. *Nat. Struct. Biol.* 1, 591–596.

Storsaeter, J., and Gustafsson, L. (1997). Absolute efficacy of acellular pertussis vaccines in household settings. *Dev Biol Stand* 89, 153–159.

Strebel, P.M., Cochi, S.L., Farizo, K.M., Payne, B.J., Hanauer, S.D., and Baughman, A.L. (1993). Pertussis in Missouri: evaluation of nasopharyngeal culture, direct fluorescent antibody testing, and clinical case definitions in the diagnosis of pertussis. *Clin Infect Dis* 16, 276–285.

Tanaka, M., Vitek, C.R., Pascual, F.B., Bisgard, K.M., Tate, J.E., and Murphy, T.V. (2003). Trends in pertussis among infants in the United States, 1980-1999. *JAMA* 290, 2968–2975.

Tang, J.W., Wilson, P., Shetty, N., and Noakes, C.J. (2015). Aerosol-Transmitted Infections—a New Consideration for Public Health and Infection Control Teams. *Curr Treat Options Infect Dis* 7, 176–201.

Templeton, K.E., Scheltinga, S.A., van der Zee, A., Diederens, B.M.W., Kruijssen, A.M., Goossens, H., Kuijper, E., and Claas, E.C.J. (2003). Evaluation of Real-Time PCR for Detection of and Discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for Clinical Diagnosis. *J Clin Microbiol* 41, 4121–4126.

Teruya, S., Hiramatsu, Y., Nakamura, K., Fukui-Miyazaki, A., Tsukamoto, K., Shinoda, N., Motooka, D., Nakamura, S., Ishigaki, K., Shinzawa, N., *et al.* (2020). *Bordetella* Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor. *MBio* 11.

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

Versteegh, F.G.A., Mertens, P.L.J.M., de Melker, H.E., Roord, J.J., Schellekens, J.F.P., and Teunis, P.F.M. (2005). Age-specific long-term course of IgG antibodies to pertussis toxin after symptomatic infection with *Bordetella pertussis*. *Epidemiol Infect* 133, 737–748.

Vestheim, D.F., Steinbakk, M., Bjørnstad, M.L., Moghaddam, A., Reinton, N., Dahl, M.L., Grude, N., and Sandven, P. (2012). Recovery of *Bordetella pertussis* from PCR-Positive Nasopharyngeal Samples Is Dependent on Bacterial Load. *J Clin Microbiol* 50, 4114–4115.

Viljanen, M.K., Ruuskanen, O., Granberg, C., and Salmi, T.T. (1982). Serological diagnosis of pertussis: IgM, IgA and IgG antibodies against *Bordetella pertussis* measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Scand J Infect Dis* 14, 117–122.

Voegele, A., O'Brien, D.P., Subrini, O., Sapay, N., Cannella, S.E., Enguéné, V.Y.N., Hessel, A., Karst, J., Hourdel, V., Perez, A.C.S., *et al.* (2018). Translocation and calmodulin-activation of the adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. *Pathog Dis* 76.

Warfel, J.M., Beren, J., and Merkel, T.J. (2012). Airborne Transmission of *Bordetella pertussis*. *The Journal of Infectious Diseases* 206, 902.

Wendelboe, A.M., Van Rie, A., Salmaso, S., and Englund, J.A. (2005). Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 24, S58-61.

Wendelboe, A.M., Njamkepo, E., Bourillon, A., Floret, D.D., Gaudelus, J., Gerber, M., Grimprel, E., Greenberg, D., Halperin, S., Liese, J., *et al.* (2007). Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr Infect Dis J* 26, 293–299.

Weyrich, L.S., Rolin, O.Y., Muse, S.J., Park, J., Spidale, N., Kennett, M.J., Hester, S.E., Chen, C., Dudley, E.G., and Harvill, E.T. (2012). A Type VI Secretion System Encoding Locus Is Required for *Bordetella bronchiseptica* Immunomodulation and Persistence In Vivo. *PLoS One* 7.

Wilson, K.E., Cassidy, P.K., Popovic, T., and Sanden, G.N. (2002). *Bordetella pertussis* Isolates with a Heterogeneous Phenotype for Erythromycin Resistance. *J Clin Microbiol* 40, 2942–2944.

Winter, K., Zipprich, J., Harriman, K., Murray, E.L., Gornbein, J., Hammer, S.J., Yeganeh, N., Adachi, K., and Cherry, J.D. (2015). Risk Factors Associated With Infant Deaths From Pertussis: A Case-Control Study. *Clin. Infect. Dis.* 61, 1099–1106.

Wood, N., and McIntyre, P. (2008). Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev* 9, 201–211; quiz 211–212.

Xu, Z., Wang, Z., Luan, Y., Li, Y., Liu, X., Peng, X., Octavia, S., Payne, M., and Lan, R. (2019a). Genomic epidemiology of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in China. *Emerg Microbes Infect* 8, 461–470.

Xu, Z., Octavia, S., Luu, L.D.W., Payne, M., Timms, V., Tay, C.Y., Keil, A.D., Sintchenko, V., Guiso, N., and Lan, R. (2019b). Pertactin-Negative and Filamentous Hemagglutinin-Negative *Bordetella pertussis*, Australia, 2013–2017. *Emerg Infect Dis* 25, 1196–1199.

Yao, K., Deng, J., Ma, X., Dai, W., Chen, Q., Zhou, K., Ye, J., Shi, W., Wang, H., Li, D., *et al.* (2020). The epidemic of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* with limited genome variation associated with pertussis resurgence in China. *Expert Rev Vaccines* 19, 1093–1099.

Yeung, K.H.T., Duclos, P., Nelson, E.A.S., and Hutubessy, R.C.W. (2017). An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 17, 974–980.

Zeddeman, A., van Gent, M., Heuvelman, C.J., van der Heide, H.G., Bart, M.J., Advani, A., Hallander, H.O., Wirsing von Konig, C.H., Riffelman, M., Storsaeter, J., *et al.* (2014). Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill.* 19.

van der Zee, A., Groenendijk, H., Peeters, M., and Mooi, F.R. (1996). The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 640–647.

van der Zee, A., Schellekens, J.F.P., and Mooi, F.R. (2015). Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev* 28, 1005–1026.

Zintgraff, J., Irazu, L., Lara, C.S., Rodriguez, M., and Santos, M. (2018). The classical *Bordetella* species and MALDI-TOF technology: a brief experience. *J Med Microbiol* 67, 1737–1742.

Zomer, A., Otsuka, N., Hiramatsu, Y., Kamachi, K., Nishimura, N., Ozaki, T., Poolman, J., and Geurtsen, J. (2018). *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. *Microb Genom* 4.



DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : CORDIER Camille..... INE : 2103011034J.....


Date, heure et lieu de soutenance :

Le 15 | 06 | 2021 à 17 h. 00. Amphithéâtre ou salle : Amphithéâtre Pauling

Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :



Avis du directeur de thèse

Nom : GAILLOT.....

Prénom : Olivier.....

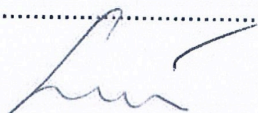
Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 7 mai 2021

Signature:





Avis du président du jury

Nom : BROUSSEAU.....

Prénom : Thierry.....

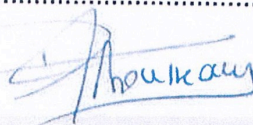
Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 07.05.2021

Signature:



Décision du Doyen

Favorable

Défavorable

Le 2/06/21.....

Le Doyen


B. DÉCAUDIN



NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille
FACULTÉ DE PHARMACIE DE LILLE
MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2020/2021

Nom : Cordier
Prénom : Camille

Titre du mémoire / thèse : Intérêts et limites de la culture de *Bordetella pertussis* à l'ère du diagnostic moléculaire. Diversité des isolats cliniques en Hauts-de-France entre novembre 2017 et mars 2019.

Mots-clés : *B. pertussis*. Biologie moléculaire. Culture. Diversité. Facteurs de virulence.

Résumé : La vaccination anti-pertussique des nourrissons introduite dans les années 1990 a réduit en quelques décennies la morbidité infantile de la coqueluche dans le monde. Cependant, des souches mutantes de *Bordetella pertussis* ont émergé dans plusieurs pays, de virulence plus marquée et/ou de moindre sensibilité à l'immunité vaccinale, et parfois résistantes aux macrolides. Il est donc indispensable de continuer à surveiller les isolats circulants. La culture de *B. pertussis* essentielle dans cet objectif est malheureusement rarement réalisée, car remplacée pour le diagnostic de coqueluche par une très sensible et spécifique PCR. L'objectif de ce travail était d'obtenir des bactéries en culture à partir d'échantillons destinés à la PCR lorsque celle-ci était positive, puis d'étudier leur diversité par deux techniques innovantes de spectrométrie, masse-MALDI-ToF et infrarouge par transformée de Fourier. Entre novembre 2017 et mars 2019, sur 1 119 échantillons cliniques consécutifs analysés par PCR coqueluche, 84 étaient positifs. Parmi eux, nous avons obtenu 23 isolats en culture, y compris à partir d'échantillons dont la PCR était faiblement positive. Tous étaient sensibles aux macrolides, et 22 sur 23 phylogéniquement proches par les 2 types d'analyse spectrométrique. La technique infrarouge semblait la plus discriminante, et pourrait être un outil rapide et peu coûteux pour différencier les isolats de *B. pertussis* avant de procéder à leur éventuelle caractérisation épidémiologique complète dans un laboratoire de référence.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH, Institut de Biochimie, Centre de Biologie et Pathologie, CHU de Lille

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Boualem SENDID, PU-PH, Service de Parasitologie-Mycologie, Centre de Biologie et Pathologie, CHU de Lille

Madame le Docteur Anne VACHÉE, PH, Unité fonctionnelle de Bactériologie-Hygiène, Laboratoire de biologie, Centre Hospitalier de Roubaix

Membre extérieur : Monsieur le Professeur Camille LOCHT, Professeur - Directeur de recherche Inserm, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille