



**HAL**  
open science

# Étude de la fonctionnalité des anticorps sériques et muqueux induits lors d'une vaccination ou d'une infection à *Bordetella pertussis*, l'agent de la coqueluche

Anaïs Thiriard

## ► To cite this version:

Anaïs Thiriard. Étude de la fonctionnalité des anticorps sériques et muqueux induits lors d'une vaccination ou d'une infection à *Bordetella pertussis*, l'agent de la coqueluche. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS070 . tel-03541205

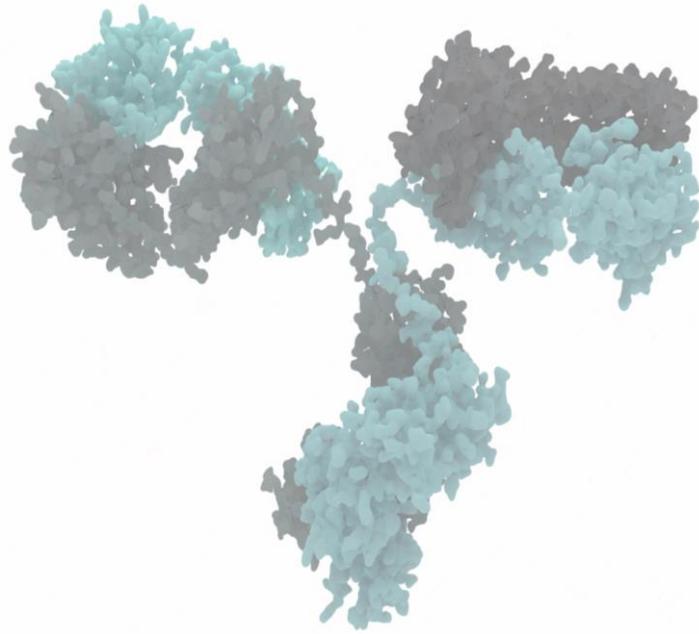
**HAL Id: tel-03541205**

**<https://theses.hal.science/tel-03541205>**

Submitted on 24 Jan 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



---

*ETUDE DE LA FONCTIONNALITE  
DES ANTICORPS SERIQUES ET  
MUQUEUX INDUITS LORS  
D'UNE VACCINATION OU  
D'UNE INFECTION A  
BORDETELLA PERTUSSIS,  
L'AGENT DE LA COQUELUCHE.*

---

Par Anaïs Thiriard

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

Présentée et soutenue publiquement par

Anaïs THIRIARD

Le 19 décembre 2019

Etude de la fonctionnalité des anticorps sériques et muqueux induits lors d'une vaccination ou d'une infection à *Bordetella pertussis*, l'agent de la coqueluche.

Dr Camille Locht  
Dr Dominique Raze

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse

**Composition du jury :**

Pr Benoit Foligné  
Pr Françoise Mascart  
Dr Christophe Paget  
Dr Elke Leuridan  
Pr Arnaud Marchant  
Dr Julie Toubiana  
Dr Christophe Carnoy

*Président*  
*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Examineur*  
*Examineur*  
*Examineur*  
*Invité*

## Remerciements

Je remercie la Région Haut de France et l'INSERM pour avoir financé ces 3 années de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Françoise Mascart et Christophe Paget pour avoir accepté d'évaluer mon travail de rédaction de thèse, ainsi qu'Arnaud Marchant, Elke Leuridan, Julie Toubiana, Christophe Carnoy et Benoit Foligné de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie sincèrement Camille Loch, mon directeur de thèse, de m'avoir fait l'honneur d'encadrer ma thèse qui aura été, pour lui, la dernière d'une longue lignée. Je tiens également à le remercier pour m'avoir prise sous son aile bienveillante, tant pour m'avoir accompagnée intellectuellement qu'humainement pendant ces 3 années de thèse. J'espère avoir répondu à l'exigence et la qualité de travail qui caractérise le laboratoire et j'espère avoir été à la hauteur de la confiance qu'il m'a été accordée pour réaliser ma thèse dans cette équipe d'excellence. De tout cœur, merci Camille pour votre sollicitude, votre accessibilité et votre expertise indéniable.

Je tiens également à remercier profondément Dominique Raze, qui m'a fait découvrir et aimer le travail de recherche et sans qui, finalement, rien n'aurait été possible. Sa bonne humeur inaltérable, son soutien dans les bons comme dans les mauvais moments, sa diplomatie, mais aussi ses compétences scientifiques multiples, ses connaissances et son sens critique m'auront particulièrement aidé pendant ces 4 ans. Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude mais merci d'avoir tenu le coup jusqu'au bout, vous avez été un mentor fabuleux !

Je remercie la famille BRIPT, qui m'a si bien accueillie, qui m'a tant appris et m'a personnellement et professionnellement fait grandir... Chacun à sa façon a participé au bon déroulement technique et scientifique de ma thèse et à mon épanouissement professionnel et personnel.

Sophie, tu auras été la première à me former « aux bonnes pratiques de laboratoire » et la première à me proposer ton aide en toutes circonstances. Tu fais preuve d'une patience impressionnante, d'un sens pédagogique unique et d'une ingéniosité surprenante. Tu auras été mon ange gardien toutes ces années, et je me souviendrai de tous ces formidables moments de partage et de complicité échangés au laboratoire et en dehors.

Anne-Sophie, ton exemplarité professionnelle et ton œil avisé m'ont réellement inspiré dans mon travail au quotidien toutes ces années. Apprendre à tes côtés est gage de rigueur, d'efficacité et de pertinence. Merci de m'avoir transmis ton savoir-

faire (au moins une petite partie) et de m'avoir éclairé sur ma vie professionnelle et personnelle. Plus qu'une collègue, nous avons partagé de très bons moments ensemble.

Je tiens également à remercier Jonathan, qui m'a apporté une aide illimitée et inconditionnelle. Sa bonne humeur contagieuse, ses remarques scientifiques pertinentes, son professionnalisme évident et son implication ont été un véritable atout pour atteindre mes objectifs de travail. Tu as été un binôme exceptionnel et une rencontre inoubliable.

Je tiens à remercier mes co-thésards, Alex et Gauthier, qui ont été un véritable soutien et avec qui j'ai partagé les hauts et les bas de la thèse. Que d'émotions ! Merci pour votre bonne humeur, ces fous-rires et ces after-work très productifs. Bon courage pour votre fin de thèse, je vous souhaite le meilleur !

Merci à Kamel et Rosangela, ces compagnons de « travail nocturne » qui m'ont soutenue pendant ces 3 années, qui m'ont aidé scientifiquement et avec qui j'ai partagé plus qu'une relation de travail. Merci à Thomas, mon voisin de paillasse et de bureau, avec qui j'ai perfectionné mon anglais et partagé de très bons moments.

Je remercie Nathalie, avec qui j'ai passé des moments mémorables pendant les congrès, mais aussi pour ses conseils scientifiques éclairés, ses questions « originales » et son soutien. Je remercie également Françoise qui m'a encouragé et soutenu dès les premiers instants, Carine qui a toujours répondu à mes nombreuses questions avec le sourire ainsi que Manue et Stéphanie pour leur bienveillance sans limite et leur bonne humeur démonstrative.

Je remercie également Philip et Alain pour leur sens critique affûté et considérablement formateur, Loïc pour son aide technique et scientifique et ses remarques constructives, Stéphane pour son soutien et sa bonne humeur communicative et Romain pour ses conseils appropriés et ses remarques judicieuses.

Je tiens également à remercier Violaine pour son aide, Rudy, Christine et Fethi qui se sont intéressés à mon travail, Marc et Claudie qui m'ont beaucoup appris à mes débuts, Joévin qui a m'apportée une aide technique, Gaëlle et Elian avec qui j'ai eu des discussions scientifiques inspirantes, et Salam, Païline et Justine pour leur gentillesse et soutien.

Ma très chère amie Elodie, merci pour m'avoir épaulée sans relâche, pour m'avoir transmis les « trucs et astuces » de labo et pour avoir pris le temps de répondre, de bon cœur, à toutes mes questions. Tu m'as appris à avoir plus confiance en moi et tu as été un modèle de travail. Mon cher ami Luis, merci pour tout ce que tu m'as apporté sur le plan professionnel et intellectuel, notamment ton exigence, ta rigueur et ton esprit critique. Tu m'as également accompagné scientifiquement me permettant de fournir un travail plus rigoureux et plus développé, et d'être plus

épanouie dans mon travail. Merci Martin d'avoir été attentif, bienveillant et tatillon avec mon travail. Tu m'as appris à avoir un regard un peu plus « contrasté ».

Je remercie également les personnes avec qui j'ai travaillé sur les plateformes techniques, mais aussi celles avec qui j'ai collaboré pendant ma thèse dans le cadre du consortium Periscope et par le biais de la fondation Thrasher.

Je tiens à présenter un merci incommensurable à mes parents, Marie-Andrée et William, qui m'ont toujours soutenue et encouragée à réaliser mes rêves, qui m'ont transmis des valeurs précieuses et ont tout fait pour que je sois épanouie. Vous m'avez appris à toujours donner le meilleur de moi et à dépasser mes limites. Agathe, ma petite sœur chérie, que j'adore et j'admire, tu m'as toujours inspirée pour être une meilleure personne, pour être une super grande sœur ! Merci d'avoir toujours été là, d'avoir veillé à me motiver pendant ces 3 années et d'avoir toujours eu confiance en moi. Merci Julien pour ton soutien et ta bonne humeur.

Adrien, nous avons tant partagé, tu m'as tant apportée... Tu as toujours été dans ma vie depuis le début de cette aventure pleine de rebondissements, tu m'as toujours apportée un soutien infini et inconditionnel et tu m'as toujours encouragée. Merci d'avoir cru si fort en moi et de m'avoir rassurée dans les moments terribles de doutes. Tu m'as donnée des ailes toutes ces années et tu sais tout ce que j'ai sur le cœur alors merci pour absolument tout !

Merci à ma merveilleuse famille et belle-famille d'avoir suivi attentivement mon parcours. Votre soutien a été précieux et extrêmement motivant.

A tous mes amis, qui ont eu confiance en moi, qui m'ont toujours soutenue et motivée et qui m'ont réconfortée dans les pires moments de doutes... Merci FX, Céline B, Maudinette, Gui, Yann, Tati, Camille W, Gogo, Ju, Hana, Ben, Lolo, Coco, Théo, Germain, Thibaut, Valou, Cauch, Lulu, Jank, Alexis, Quentin, Camille V, Justine W, Greg, Julie, Gaylor, Laurent, Bast, Céline D, Bruno, Kelly, Justine C, Julien, Flo, Fufou, Loulou, Kévin, Max...

## Abréviations

Ac : anticorps

ACT : adénylate cyclase, toxine de *B. pertussis*

ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps

ADCP : phagocytose à médiation cellulaire dépendante d'anticorps

BCR : récepteur des lymphocytes B

BG : milieu de culture solide Bordet-Gengou

BGIA : test d'inhibition de croissance de *Bordetella*

BrkA : facteur de résistance au sérum, facteurs de virulence de *B. pertussis*

*bvg* : *Bordetella* virulence genes

Bvg<sup>+</sup> : phase de virulence de *B. pertussis*

Bvg<sup>-</sup> : phase d'avirulence de *B. pertussis*

Bvg<sup>i</sup> : phase intermédiaire de virulence de *B. pertussis*

CDC : cytotoxicité dépendante d'anticorps

CFU : unité formant une colonie

CMI : concentration minimale inhibitrice

CR : récepteur au complément

CRD : domaine de reconnaissance aux carbohydrates

DNT : toxine dermonécrotique, toxine de *B. pertussis*

DO<sub>600nm</sub> : densité optique à 600nm

ELISA : dosage d'immuno-absorption par enzyme liée

Fab : fragment portant le site de fixation à l'antigène

Fc : fragment cristallisable

FcR : récepteur au fragment cristallisable des anticorps

FHA : hémagglutinine filamenteuse de *B. pertussis*

Fim : fimbriae, adhésine de *B. pertussis*

Fv : fragment variable

HBD : domaine fixant l'héparine  
HC : chaîne lourde d'anticorps  
kDa : kilodaltons, unité de masse atomique  
KO : « knock-out », déficience de gène  
IC<sub>50</sub> : concentration inhibitrice médiane  
ID<sub>50</sub> : dilution inhibitrice médiane  
Ig : immunoglobuline  
IL : interleukine  
LB : lymphocytes B  
LC : chaîne légère d'anticorps  
LT : lymphocyte T  
LOS : lipooligosaccharides  
LPS : lipopolysaccharides  
mAb : anticorps monoclonal  
PCR : réaction de polymérase en chaîne  
PRN : pertactine, adhésine de *B. pertussis*  
PTX : toxine pertussique, toxine de *B. pertussis*  
RLU : unité relative de luminescence  
RGD : domaine riche en arginine-glycine-aspartate  
SBA : test de bactéricidie du sérum  
SS : milieu de culture liquide Stainer-Schölte  
Tcf : facteur de colonisation trachéale, adhésine de *B. pertussis*  
TCT : toxine cytotrachéale, toxine de *B. pertussis*  
THIJS : milieu de culture liquide Thalen-Ijssel  
*vags* : virulence-associated gene  
*vrgs* : virulence-repressed gene  
WT : « wild-type », caractère sauvage d'un gène

# Table des illustrations

<b>FIGURE 1:</b> PORTRAITS (DE GAUCHE A DROITE) DE GUILLAUME DE BAILLOU, MEDECIN FRANÇAIS DU 16EME ET DEBUT 17EME SIECLE AYANT DECRIT LA COQUELUCHE ; ET DE JULES BORDET ACCOMPAGNE D'OCTAVE GENGOU, MICROBIOLOGISTES BELGES DU 19EME ET 20EME SIECLE AYANT ISOLES LA BACTERIE RESPONSABLE DE LA COQUELUCHE. ....	1
<b>FIGURE 2:</b> IMAGES DE <i>B. PERTUSSIS</i> . DE GAUCHE A DROITE, VU DES COCCOBACILLES PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (D'APRES CONOVER ET AL., 2012) ET DES COLONIES ISOLEES EN GOUTTELETTES DE MERCURE APRES 5 JOURS D'INCUBATION SUR BOITE SANG BORDET-GENGOU.....	2
<b>FIGURE 3:</b> ECHEANCIER (EN SEMAINES) DES DIFFERENTES PHASES DE LA COQUELUCHE, DE LA PERIODE D'INFECTIVITE ET DES TESTS DIAGNOSTICS DE LABORATOIRE. SOURCE : RAPPORT 2018 DE L'OMS SUR LA COQUELUCHE.....	4
<b>FIGURE 4:</b> DONNEES DE SURVEILLANCE DES CAS DE COQUELUCHE AUX ETATS-UNIS PAR LE CENTRE DE CONTROLE DES MALADIES (CDC). A GAUCHE, L'INCIDENCE DES CAS REPORTES DE COQUELUCHE PAR CATEGORIE D'AGE ENTRE 1990 ET 2017. A DROITE, LE NOMBRE DE CAS DE COQUELUCHE REPORTES ENTRE 1922 ET 2017 AVEC INDICATION DE L'INTRODUCTION DU VACCIN CELLULAIRE (DTP) ET DES VACCINS ACELLULAIRES (DTAP ET TDAP). SOURCE : CDC.....	5
<b>FIGURE 5:</b> LES FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>B. PERTUSSIS</i> ET LEUR REGULATION. LES ADHESINES SONT REPRESENTEES EN BLEU, LES TOXINES EN ROUGE, LES TRANSPORTEURS EN GRIS ET LE SYSTEME A 2 COMPOSANTS EN BEIGE. SOURCE : LOCHT ET AL., 2001. ....	10
<b>FIGURE 6:</b> REGULATION DES GENES DE <i>B. PERTUSSIS</i> SOUS LE CONTROLE DU REGULON BvGASR ET RISASK, SOUS DES CONDITIONS BASALES, MODE BvG <sup>+</sup> EN FIGURE (A), ET SOUS CONDITIONS INHIBITRICES, MODE BvG <sup>-</sup> EN FIGURE (B). SOURCE : CHEN ET AL., 2019.....	11
<b>FIGURE 7:</b> SCHEMA DE L'ACTIVITE DU REGULON BvGAS. BvGA EST UN ACTIVATEUR QUI VA MODULER L'EXPRESSION DES GENES CIBLES EN REPONSE A LA STIMULATION DE BvGS, UN SENSEUR KINASE. A 37°C ET <i>IN VIVO</i> , BvGA EST PHOSPHORYLE, ACTIVE L'EXPRESSION DES VAGS (LIGNE ROUGE) ET REPRIME L'EXPRESSION DES VRGS (LIGNE BLEUE) ; C'EST LA PHASE BvG <sup>+</sup> . CETTE PHASE EST CARACTERISEE PAR L'EXPRESSION MAXIMALE DES GENES CODANT LES ADHESINES ( <i>FHAB</i> , <i>FIM2</i> , <i>FIM3</i> ) ET LES TOXINES ( <i>CYA</i> , <i>PTX</i> ). A 25°C, EN PRESENCE DE MODULATEURS CHIMIQUES OU EN MILIEU CARENCE, BvGA N'EST PAS PHOSPHORYLE, ACTIVE LES VRGS ET REPRIME LES VAGS ; C'EST LA PHASE BvG <sup>-</sup> . LA PHASE BvG <sup>+</sup> APPARAÎT AVANT L'ACTIVATION COMPLETE DE LA PHASE BvG <sup>+</sup> ET JOUERAÎT UN RÔLE DANS LA TRANSMISSION DU PATHOGENE GRACE A L'EXPRESSION DU GENE <i>BIPA</i> . SOURCE : MELVIN ET AL., 2014.....	11
<b>FIGURE 8:</b> MECANISME D'ACTION DE LA TOXINE PERTUSSIQUE SUR LES PROTEINES G MEMBRANAIRES. L'OLIGOMERE B DE LA PT VA PERMETTRE LA FIXATION DE LA TOXINE SUR LES CELLULES CIBLES ALORS QUE L'OLIGOMERE A PORTE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE. LA PT VA DECOUPLER LA SOUS-UNITE A DES PROTEINES Gi/O QUI EST LIE AU GDP INTRACELLULAIRE A L'AIDE D'UN COFACTEUR NAD <sup>+</sup> EN LIBERANT UN MEDIATEUR (ADP-RIBOSE- AI/O-GDP). CELUI-CI VA ETRE UTILISE PAR UNE ADENYLATE CYCLASE INTRACELLULAIRE POUR FORMER UN MESSAGER SECONDAIRE, AMPC, QUI VA EXERCER DIFFERENTS EFFETS PLEIOTROPQUES DANS LA CELLULE CIBLE D'UNE PART ET INHIBER LES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES Gi (GiPCR) D'AUTRE PART. SOURCE : DORJI ET AL., 2018.....	13
<b>FIGURE 9:</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DOMAINES STRUCTURELS ET FONCTIONNELS DE LA FHA. FORME DE LA FHA MATURE AVEC LA REPRESENTATION DES DOMAINES HBD, RGD ET CRD. LES REGIONS R1 ET R2, EN BLEUES, PRESENTENT DES SEQUENCES REPETEES PROPRES A CHACUNE ET LES REGIONS B0, B1 ET B2, EN BLANC, PRESENTENT DES COPIES DE MOTIFS SIMILAIRES MOINS CONSERVES QUE LES REGIONS R. SOURCE : ROMERO ET AL., 2014.....	15
<b>FIGURE 10:</b> SCHEMA RECAPITULATIF DES EFFETS IMMUNOMODULATEURS DE <i>B. PERTUSSIS</i> SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE L'HOTE. SOURCE : HIGGS ET AL., 2012.....	18
<b>FIGURE 11:</b> DETAIL DE LA REPOSE IMMUNITAIRE CELLULAIRE ET HUMORALE INDUITE SUITE A UNE INFECTION NATURELLE OU UNE IMMUNISATION AVEC LES VACCINS WP OU AP. SOURCE : KAPIL ET AL., 2019.....	24
<b>FIGURE 12:</b> MODELE STRUCTURAL EN FORME DE « Y » D'UN MONOMERE D'ANTICORPS. IL EST COMPOSE DE 2 CHAINES LOURDES (HC) ET 2 CHAINES LEGERES (LC) IDENTIQUES 2 A 2. UNE HC CONTIENT 1 REGION VARIABLE (VH) ET 3 A 4 REGIONS CONSTANTES (CH <sub>x</sub> ), ALORS QUE LA LC EST CONSTITUEE DE 1 DOMAINE VARIABLE (VL) ET 1 DOMAINE CONSTANT (CL). LES DOMAINES VARIABLES PRESENTENT DES REGIONS HYPERVARIABLES (CDR) QUI FORMENT LE PARATOPE, ZONE DE FIXATION DE L'EPITOPE DE L'ANTIGENE. LES CHAINES SONT RELIEES ENTRE-ELLES PAR DES PONTS DISULFURES. LES BRAS ET LE CORPS DU « Y » SONT RELIES PAR UNE REGION CHARNIERE. UN ANTICORPS EST CARACTERISE PAR SON FRAGMENT EFFECTEUR (Fc) ET SON FRAGMENT PERMETTANT LA FIXATION DE L'ANTIGENE (Fab). SOURCE : <a href="https://teaching.ncl.ac.uk/BMS/wiki/index.php/Antibody">HTTPS://TEACHING.NCL.AC.UK/BMS/WIKI/INDEX.PHP/ANTIBODY</a> .....	28
<b>FIGURE 13:</b> REPRESENTATION DE LA STRUCTURE DES 5 ISOTYPES D'IMMUNOGLOBULINES. LES IGG, IGD ET IGE SERIQUES SONT MONOMERIQUES ALORS QUE LES IGA SECRETOIRES SONT DIMERIQUES ET LES IGM SERIQUES PENTAMERIQUES. LES IGG, IGD ET IGA PEUVENT ETRE COMPOSEES DE 3 DOMAINES CONSTANTS SUR LA HC ET LES IGE ET IGM DE 4 DOMAINES CONSTANTS SUR LA HC. LES IGA SECRETOIRES ET IGM SERIQUES POSSEDENT UNE CHAÎNE J RELIANT LES DIFFERENTS MONOMERES ENTRE EUX,	

ET CES IGA SONT ENTOUREES D'UN COMPOSANT SECRETOIRE. LA STRUCTURE DES REGIONS CHARNIERES EST DIFFERENTE POUR CHAQUE ISOTYPE. SOURCE : <a href="https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-isotypes-subtypes/">HTTPS://ABSOLUTEANTIBODY.COM/ANTIBODY-RESOURCES/ANTIBODY-OVERVIEW/ANTIBODY-ISOTYPES-SUBTYPES/</a> .....	30
<b>FIGURE 14:</b> TRANSCYTOSE DES IGA DIMERIQUES A TRAVERS LES CELLULES EPITHELIALES MUCOSALES. LA CHAINE J DES IGA SE FIXE AU RECEPTEUR D'IMMUNOGLOBULINE POLYMERIQUE (PIGR) AU POLE BASAL POUR QUE LE COMPLEXE SOIT ENDOCYTE DANS DES VESICULES A CLATHRINE, PUIS DIRIGE VERS LE POLE APICAL POUR UN RELARGAGE D'IgA SECRETOIRES (SIGA) DANS LE LUMEN. CES SIGA EMPORTEENT UNE PARTIE DU PIGR, APPELE COMPOSANT SECRETOIRE. SOURCE : <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Transcytosis_of_dimeric_iga_and_free_pigr.jpg">HTTPS://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/WIKI/FILE:TRANSCYTOSES_OF_DIMERIC_IGA_AND_FREE_PIGR.JPG</a> .....	31
<b>FIGURE 15:</b> TABLEAU RECAPITULATIF DES PROPRIETES FONCTIONNELLES EN FONCTION DES DIFFERENTS ISOTYPES D'IGG HUMAINS. SOURCE : VIDARSSON ET AL., 2014. ....	33
<b>FIGURE 16:</b> REPRESENTATION DES 4 ISOTYPES IGG. TOUS LES ISOTYPES POSSEDT 3 REGIONS CONSTANTES ET 1 REGION VARIABLE SUR LA CHAINE LOURDE ET 1 REGION CONSTANTE ET 1 REGION VARIABLE SUR LA CHAINE LEGERE. LA REGION CHARNIERE (HINGE) VARIE SELON L'ISOTYPE. SOURCE : ISSU DE VIDARSSON ET AL., 2014. ....	34
<b>FIGURE 17:</b> (A) REPRESENTATION DES 2 ISOTYPES D'IgA MONOMERIQUES RETROUVES DANS LE SANG. LES DOMAINES CONSTANTS SONT NOTES C <sub>x</sub> ET LES DOMAINES VARIABLES SONT NOTES V <sub>x</sub> . LES CHAINES LOURDES (VH ET CH <sub>1</sub> A CH <sub>3</sub> ) SONT REPRESENTEES EN BLEU ET LES CHAINES LEGERES (VL ET CL) EN VERT. LES FRAGMENTS FAB, FC ET LA REGION CHARNIERE (HINGE) SONT PRECISES AINSI QUE LES SITES DE N- ET O-GLYCOSYLATION ET LA ZONE DE FIXATION AU RECEPTEUR. (B) REPRESENTATION DU DIMERE IGA SECRETE (SIGA) AU NIVEAU DES MUQUEUSES PAR TRANSCYTOSE. LES DIMERES SONT RELIES ENTRE-EUX PAR LA CHAINE J ET LE COMPOSANT SECRETOIRE. SOURCE : VAN EGMOND ET AL., 2001.....	35
<b>FIGURE 18:</b> REPRESENTATION D'UN MONOMERE D'IgM (A GAUCHE) ET D'UN PENTAMERE D'IgM (A DROITE). LES CHAINES LOURDES SONT REPRESENTEES EN VERT ET LES CHAINES LEGERES EN BLEU. LES SITES DE N-GLYCOSYLATION SONT SYMBOLISES PAR DES POINTS VERTS. SOURCE : BLANDINO ET AL., 2019. ....	36
<b>FIGURE 19:</b> DISTRIBUTION DES RECEPTEURS HUMAINS CLASSIQUES ET ATYPIQUE AUX IGG SUR LES CELLULES. LE + INDIQUE UNE EXPRESSION DU RECEPTEUR, LE (+) UNE EXPRESSION INDUCTIBLE, LE +/- UNE FAIBLE VOIRE RARE EXPRESSION ET LE – CORRESPOND A DES CELLULES N'EXPRIMANT PAS LE RECEPTEUR. NA SIGNIFIE NON-ANALYSE. SOURCE : <a href="http://www.sinobiological.com/flow-cytometry-fcm-facs-antibody-verified-by-fc-receptor-blocking.html">WWW.SINOBIOLOGICAL.COM/FLOW-CYTOOMETRY-FCM-FACS-ANTIBODY-VERIFIED-BY-FC-RECEPTOR-BLOCKING.HTML</a> .....	43
<b>FIGURE 20:</b> MECANISME D'EMISSION DE LUMINESCENCE. LES BACTERIES METABOLIQUEMENT ACTIVES LIBERENT DANS LE MILIEU DE L'ATP INTRACELLULAIRE SUITE A L'AJOUT DU REACTIF BACTITER-GLO (PROMEGA) QUI CONTIENT UN DETERGENT. LE REACTIF CONTIENT EGALEMENT DE LA LUCIFERINE ET DE LA LUCIFERASE, ENZYME QUI VA OXYDER LA LUCIFERINE EN OXYLUCIFERINE EN EMETTANT DES PHOTONS. CETTE ENZYME EST DEPENDANTE D'ATP, DE MAGNESIUM ET D'OXYGENE. L'EMISSION DE PHOTONS EST PROPORTIONNELLE A LA CONCENTRATION D'ATP LIBREE DONC DEPEND DU NOMBRE DE BACTERIES VIABLES .....	74
<b>FIGURE 21:</b> ACTIVITE INHIBITRICE DE L'ANTISERUM STANDARD (NIBSC, 06/140) DECOMPLEMENTE ET RECOMPLEMENTE AVEC 2.5% DE SERUM HUMAIN DEplete EN IGG-IGM MESURE EN BGIA. (A) L'ACTIVITE REPRESENTE LA SURVIE BACTERIENNE DE LA SOUCHE DE LABORATOIRE, BPSM (ROND), ET D'UN ISOLAT CLINIQUE, B1917 (CARRE), CULTIVEE DANS DU SS (EN NOIR) OU DU THIIJS (EN BLANC), EN FONCTION DE LA DILUTION DU SERUM STANDARD DECOMPLEMENTE PUIS RECOMPLEMENTE. LES RESULTATS DE SURVIE SONT NORMALISES EN POURCENTAGES DE SURVIE PAR RAPPORT A DES CONTROLES MESURANT L'ACTIVITE DU COMPLEMENT SEUL SUR LES BACTERIES. (B) REPRESENTATION DES AIRES SOUS LA COURBE (AUC) ISSUES DE LA FIGURE (A) EN FONCTION DE LA SOUCHE ET DU TYPE DE CULTURE LIQUIDE ASSOCIEE. LES RESULTATS REPRESENTENT 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES REALISEES EN DUPLIQUA. LE TEST STATISTIQUE APPLIQUE EN FIGURE (B) EST UN MANN-WHITNEY BILATERAL AVEC *p<0.1 ET **p<0.01. ....	79
<b>FIGURE 22:</b> COURBES BGIA D'ACTIVITE DE L'ANTISERUM STANDARD (NIBSC, 06/140) SUR LA CROISSANCE DE BPSM CULTIVEE EN SS (A), OU EN THIIJS (B) ET B1917 CULTIVEE EN SS (C) OU EN THIIJS (D). LES 3 COURBES D'INHIBITION DE CROISSANCE EN FONCTION DU SERUM, A SAVOIR LE SERUM NON-DECOMPLEMENTE (NOTE S), DECOMPLEMENTE (NOTE SHI) ET RECOMPLEMENTE AVEC 2.5% DE SERUM HUMAIN DEplete EN IGG-IGM (NOTE SHIC <sub>2.5</sub> ) SONT REPRESENTEES POUR CHAQUE CONDITION DE CULTURE DES <i>B. PERTUSSIS</i> . CES GRAPHIQUES REGROUPENT LES FIGURES DE LA PUBLICATION SCIENTIFIQUE (COURBES S ET SHI) ET LA FIGURE 21A. ....	80
<b>FIGURE 23:</b> COURBE DE CROISSANCE DE BPSM EN MILIEU LIQUIDE SS. LA DENSITE OPTIQUE EST MESUREE A 600NM EN CONTINU PENDANT 3 JOURS (4320 HEURES). LA COURBE BLEUE REPRESENTE LA MOYENNE DE 2 EXPERIENCES INDEPENDENTES, ET LES LIGNES POINTILLEES NOIRES LES LIMITES SUPERIEURES ET INFERIEURES DE L'ECART-TYPE A LA MOYENNE. LES FLECHES SYMBOLISENT DES POINTS CLES DES PHASES DE CROISSANCE DE <i>B. PERTUSSIS</i> : 6H = FIN DE PHASE DE LATENCE, 16H = PHASE EXPONENTIELLE, 24H = MILIEU DE PHASE EXPONENTIELLE ET 40H = PHASE STATIONNAIRE. ....	82
<b>FIGURE 24 :</b> EVALUATION DE LA RESISTANCE AU COMPLEMENT HUMAIN SUR LA SURVIE BACTERIENNE DE BPSM EN FONCTION DE LA PHASE DE CROISSANCE DES BACTERIES EN BGIA. LA MESURE DE BGIA A ETE REALISE APRES 4H D'INCUBATION AVEC LE COMPLEMENT. LA SOURCE DE COMPLEMENT UTILISEE ETAIT LE SERUM HUMAIN DEplete EN IGG ET IGM A LA CONCENTRATION FINALE DE 10%, 5%, 2.5% ET 1%. LES BACTERIES ONT ETE PRELEVEES A DIFFERENTS TEMPS DE CULTURE LIQUIDE DANS DU SS, 6H, 16H, 24H ET 48H ET CORRESPONDENT RESPECTIVEMENT A LA FIN DE LA PHASE DE LATENCE (LLP), AU DEBUT DE LA PHASE EXPONENTIELLE (EEP), AU MILIEU DE LA PHASE EXPONENTIELLE ET EN MILIEU DE PHASE STATIONNAIRE (MSP),	

RESPECTIVEMENT. LLP= LATE LATENCY PHASE, EEP= EARLY EXPONENTIAL PHASE, MEP= MID-EXPONENTIAL PHASE, MSP= MID-STATIONARY PHASE. LE GRAPHE REPRESENTE LES MOYENNES ET LES ECART-STANDARDS DE 2 EXPERIENCES INDEPENDANTES.....	83
<b>FIGURE 25:</b> GEL SDS-POLYACRYLAMIDE APRES PURIFICATION DU SURNAGEANT DES 9 HYBRIDOMES PRODUISANT DES MABS ANTI-FHA, NOTE DE F1 A F9. LE MARQUEUR DE TAILLE SE TROUVE A L'EXTREME GAUCHE DU GEL, ET LES TAILLES SONT EXPRIMEES EN KDA. LES CHAINES LOURDES SE TROUVENT A ENVIRON 50 KDA ET LES CHAINES LEGERES A 25 KDA. CE GEL EST REPRESENTATIF ET A ETE REPRODUIT AU MOINS 2 FOIS POUR CHAQUE MAB. ....	91
<b>FIGURE 26:</b> REPRESENTATION DES CONSTRUCTIONS DES PROTEINES HYBRIDES CONSTITUEES DE LA « MALTOSÉ-BINDING PROTEIN » (MBP) ET DES FRAGMENTS (PRECISES EN ACIDES AMINES, AA) ISSUS DE FHA. (A) IDENTIFICATION DES PROTEINES CODEES PAR PMAL2 (DE 15 A 440 AA), PMAL80 (DE 203 A 860 AA), PMAL83 (DE 860 A 1652 AA), PMAL84 (DE 1652 A 3225 AA) ET PMAL85 (DE 1652 A 2111 AA). (B) IDENTIFICATION DES SOUS-FRAGMENTS DE LA PROTEINE CODEE PAR PMAL85 EN CELLES CODEES PAR PMAL85-1 (DE 1653 A 1799 AA), PMAL85-2 (DE 1781 A 1923 AA), PMAL85-3 (DE 1880 A 2040 AA) ET PMAL85-4 (DE 2022 A 2111 AA). ....	92
<b>FIGURE 27:</b> WESTERN-BLOT DES 9 MABS ANTI-FHA, NOTES DE F1 A F9, SUR LES PROTEINES PURIFIEES CODEES PAR LE PLASMIDE VIDE - PMALC2X- ET DES PLASMIDES CONTENANT LES TRONCATS DE FHA - PMAL2/80/83/84/85. DES PUICTS CONTROLES BPSM ET BPGR4 CONTIENNENT LES PROTEINES DE SURNAGEANT DE CULTURE CORRESPONDANTS. A L'EXTREME GAUCHE DES MEMBRANES SE TROUVE LE MARQUEUR DE TAILLE, AVEC LES POIDS MOLECULAIRES EN KDA. LA COLORATION ROSE INDIQUE UNE SUREXPOSITION DE LA MEMBRANE. CES GELS ONT ETE REALISES EN DUPLIQUA. ....	95
<b>FIGURE 28:</b> WESTERN-BLOT DES 9 MABS ANTI-FHA, NOTES DE F1 A F9, SUR LES PROTEINES PURIFIEES CODEES PAR LE PLASMIDE VIDE - PMALC2X- ET DES PLASMIDES CONTENANT LES TRONCATS DE FHA – PMAL85 ET PMAL85-1/2/3/4. A L'EXTREME GAUCHE DES MEMBRANES SE TROUVE LE MARQUEUR DE TAILLE, AVEC LES POIDS MOLECULAIRES EN KDA. CES GELS ONT ETE REALISES EN DUPLIQUA. ....	96
<b>FIGURE 29:</b> ELISA REALISES SUR LES 9 MABS ANTI-FHA, (A) CONTRE DES BACTERIES ENTIERES BPSM (FHA <sup>+</sup> ) ET BGR4 (FHA <sup>-</sup> ), (B) CONTRE UN LYSAT DES BACTERIES BPSM (FHA <sup>+</sup> ) ET BGR4 (FHA <sup>-</sup> ), (C) CONTRE DE LA FHA PURIFIEE OU (D) CONTRE LES PROTEINES DE FUSION PURIFIEES CODEES PAR PMAL85 ET PMAL83. BPGR4 ET PMAL83 ETAIENT UTILISES COMME CONTROLES NEGATIFS. LES UNITES SONT EXPRIMEES EN TITRES IGG. LES RESULTATS PRESENTES SONT ISSUS DE 2 EXPERIENCES INDEPENDANTES. ....	97
<b>FIGURE 30:</b> SENSORGRAMME DES PROFILS D'ASSOCIATION ET DE DISSOCIATION (MESURE EN « RESONNANCE UNIT », RU) DES 9 MABS ANTI-FHA (100 MM) A LA FHA (10 µG/ML) EN FONCTION DU TEMPS (EN SECONDES). CETTE REPRESENTATION REGROUPE LES COURBES DE 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES POUR CHAQUE MAB. ....	98
<b>FIGURE 31:</b> RESULTATS DES BGIA REALISES SUR LES MABS F2 (A), F3 (B), F4 (C) ET F7 (D) EN FONCTION DE DOSES CROISSANTES DE COMPLEMENT DE BEBE LAPIN (BRC). LES BARRES NOIRES REPRESENTENT L'ACTIVITE DU MAB SEUL A 0% DE BRC ET L'ACTIVITE ANTICORPS DEPENDANTE DE COMPLEMENT DE 1% A 5% DE BRC. LES BARRES BLANCHES REPRESENTENT LE MAXIMUM DE CROISSANCE DES BACTERIES A 0% DE BRC ET L'ACTIVITE DU COMPLEMENT SEUL DE 1% A 5% DE BRC. CES GRAPHES REPRESENTENT LA MOYENNE DE 3 EXPERIENCES. UN TEST KRUSKAL-WALLIS MONTRE UNE SIGNIFICATIVITE POUR LE F3 A 5% DE BRC, P <sub>VALUE</sub> =0.0237. ....	100
<b>FIGURE 32:</b> INFECTION DE CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES A549 APRES 2H D'INCUBATION AVEC UNE SOUCHE DE <i>B. PERTUSSIS</i> EXPRIMANT LA GFP, OBSERVEE EN MICROSCOPIE OPTIQUE CONFOCAL. LES NOYAUX DES CELLULES SONT MARQUES EN BLEU AVEC DU DAPI ET LE CYTOPLASME EST MARQUE PAR UN TRACEUR ROUGE. (A) PROJECTION D'INTENSITE MAXIMALE OBTENUE PAR EMPILEMENT DES 18 COUPES HORIZONTALES (Z STACK) ESPACEES DE 0.56 µM. (B) DECONVOLUTION ET REPRESENTATION 3D DE L'IMAGE A. ....	102
<b>FIGURE 33:</b> RESULTATS DE COLONISATION PULMONAIRE 3H APRES INFECTION (D0) ET 7 JOURS APRES INFECTION (D7) DE SOURIS SAUVAGES (WT) OU DEFICIENTE POUR LES RECEPTEURS Fcγ (KO) IMMUNISES AVEC DES MABS OU NON. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN ECHELLE LOGARITHMIQUE. LES GROUPES PBS REPRESENTENT LA MOYENNE DE 3 SOURIS ET LES GROUPES DE MABS ANTI-FHA (F3 ET F8) ET ANTI-PT (1B7) REPRESENTENT LA MOYENNE DE 4 SOURIS. ....	103
<b>FIGURE 34:</b> CALENDRIER DE VACCINATION, D'INFECTION ET DE PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES. ....	107
<b>FIGURE 35 :</b> RESULTATS D'EXPERIENCE D'IMMUNISATION PASSIVE. (A) COLONISATION NASALE (NOIR) ET PULMONAIRE (BLANC) 3H (D0) ET 7 JOURS (D7) APRES INFECTION INTRA-NASALE DE SOURIS PREALABLEMENT IMMUNISEES AVEC DU SERUM ISSU DE SOURIS NAÏVES (NAÏVE), OU VACCINEES AVEC INFANRIX® (AP) OU SHAN5 (WP). CE GRAPHIQUE REPRESENTE LA MEDIANE DE 2 EXPERIENCES INDEPENDANTES AVEC N(NAÏVE)=6 ET N(AP/WP)=9. UN TEST MANN-WHITNEY A ETE APPLIQUE. ELISA SUR LES SERUMS TRANSFERES CONTRE UN LYSAT TOTAL DE BACTERIES POUR LES MESURES D'ANTICORPS SERIQUES (B) IGA ET (C) IGG TOTAUX, IGG1, IGG2A, IGG2B ET IGG3. ....	109
<b>FIGURE 36:</b> COMPARAISON DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES SERA NON-DECOMPLEMENTES (S EN NOIR) ET DECOMPLEMENTES (SHI EN BLANC) PROVENANT DE SOURIS NAÏVES OU VACCINEES AVEC AP OU WP EVALUEE PAR BGIA. LES AIRES SOUS LA COURBE (AUC) REPRESENTENT LA SURVIE ESTIMEE PAR BGIA EN FONCTION DES DILUTIONS CROISSANTES DE SERUM. PLUS L'AUC EST FAIBLE, PLUS LE SERUM EST INHIBITEUR. CE GRAPHIQUE REPRESENTE LA MOYENNE DE 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES. ....	111

- FIGURE 37:** CINETIQUES DE COLONISATION DE SOURIS BALB/C. LES SOURIS ONT ETE VACCINEES, PAR VOIE SOUS-CUTANEE, 2 FOIS A 4 SEMAINES D'INTERVALLE AVEC  $1/10^{\text{EME}}$  DE LA DOSE HUMAINE D'INFANRIX<sup>®</sup> HEXA (AP-COURBE ROUGE) OU SHAN5<sup>®</sup> (WP-COURBE VERTE) OU N'ONT PAS ETE VACCINES (PBS-COURBE BLEUE). LES SOURIS ONT ENSUITE ETE INFECTEES 4 SEMAINES APRES LA 2EME DE DOSE DE VACCIN AVEC  $10^6$  CFU B1917 (TRAIT PLEIN) OU AVEC  $10^5$  CFU B1917 (TRAIT POINTILLE) PAR VOIE INTRANASALE. LA COLONISATION PULMONAIRE (A) ET NASALE (B) A ETE EVALUEE A 3H (D0), 1 SEMAINE (D7), 2 SEMAINES (D14), 4 SEMAINES (D28) ET 8 SEMAINES (D56) APRES INFECTION. CHAQUE POINT DE CINETIQUE ET CHAQUE GROUPE DE SOURIS SONT REPRESENTES PAR LA MEDIANE AVEC L'INTERQUARTILE DE N=5 SOURIS. LES STATISTIQUES SONT REALISEES AVEC UN TEST MANN-WHITNEY, AVEC  $^{**}p<0.005$  ET  $^{***}p<0.0005$ . ..... 114
- FIGURE 38:** CINETIQUES DE COLONISATION DE SOURIS C57BL/6. LES SOURIS ONT ETE VACCINEES, PAR VOIE SOUS-CUTANEE, 2 FOIS A 4 SEMAINES D'INTERVALLE AVEC  $1/10^{\text{EME}}$  DE LA DOSE HUMAINE D'INFANRIX<sup>®</sup> HEXA (AP-COURBE ROUGE) OU SHAN5<sup>®</sup> (WP-COURBE VERTE) OU N'ONT PAS ETE VACCINES (PBS-COURBE BLEUE). LES SOURIS ONT ENSUITE ETE INFECTEES 4 SEMAINES APRES LA 2EME DE DOSE DE VACCIN AVEC  $10^6$  CFU B1917 (TRAIT PLEIN) OU AVEC  $10^5$  CFU B1917 (TRAIT POINTILLE) PAR VOIE INTRANASALE. LA COLONISATION PULMONAIRE (A) ET NASALE (B) A ETE EVALUEE A 3H (D0), 1 SEMAINE (D7), 2 SEMAINES (D14), 4 SEMAINES (D28) ET 8 SEMAINES (D56) APRES INFECTION. CHAQUE POINT DE CINETIQUE ET CHAQUE GROUPE DE SOURIS SONT REPRESENTES PAR LA MEDIANE AVEC L'INTERQUARTILE DE N=5 SOURIS. LES STATISTIQUES SONT REALISEES AVEC UN TEST MANN-WHITNEY, AVEC  $^{***}p<0.0005$ . ..... 116
- FIGURE 39:** CINETIQUES DE COLONISATION DE SOURIS IL17<sup>-/-</sup>. LES SOURIS ONT ETE VACCINEES, PAR VOIE SOUS-CUTANEE, 2 FOIS A 4 SEMAINES D'INTERVALLE AVEC  $1/10^{\text{EME}}$  DE LA DOSE HUMAINE D'INFANRIX<sup>®</sup> HEXA (AP-COURBE ROUGE) OU SHAN5<sup>®</sup> (WP-COURBE VERTE) OU N'ONT PAS ETE VACCINEES (PBS-COURBE BLEUE). LES SOURIS IL17<sup>-/-</sup> (KO-COURBE POINTILLE) ONT ETE INFECTEES 4 SEMAINES APRES LA 2EME DE DOSE DE VACCIN AVEC  $10^5$  CFU B1917. LES COURBES DE COLONISATION SONT COMPAREES AVEC CELLES OBTENUES POUR LES C57BL/6 (WT-TRAIT PLEIN). LES COLONISATIONS PULMONAIRES (A) ET NASALE (B) ONT ETE EVALUEES A 3H (D0), 1 SEMAINE (D7), 2 SEMAINES (D14), 4 SEMAINES (D28) ET 8 SEMAINES (D56) APRES INFECTION. CHAQUE POINT DE CINETIQUE ET CHAQUE GROUPE DE SOURIS SONT REPRESENTES PAR LA MEDIANE AVEC L'INTERQUARTILE DE N=5 SOURIS. LES STATISTIQUES SONT REALISEES AVEC UN TEST MANN-WHITNEY, AVEC  $^{***}p<0.005$ . ..... 118
- FIGURE 40:** CINETIQUES DE COLONISATION DE SOURIS PIGR<sup>-/-</sup>. LES SOURIS ONT ETE VACCINEES, PAR VOIE SOUS-CUTANEE, 2 FOIS A 4 SEMAINES D'INTERVALLE AVEC  $1/10^{\text{EME}}$  DE LA DOSE HUMAINE D'INFANRIX<sup>®</sup> HEXA (AP-COURBE ROUGE) OU SHAN5<sup>®</sup> (WP-COURBE VERTE) OU N'ONT PAS ETE VACCINEES (PBS-COURBE BLEUE). LES SOURIS PIGR<sup>-/-</sup> (KO-COURBE POINTILLE) ONT ETE INFECTEES 4 SEMAINES APRES LA 2EME DE DOSE DE VACCIN AVEC  $10^6$  CFU B1917. LES COURBES DE COLONISATION SONT COMPAREES AVEC CELLES OBTENUES POUR LES C57BL/6 (WT-TRAIT PLEIN). LA COLONISATION PULMONAIRE (A) ET NASALE (B) A ETE EVALUEE A 3H (D0), 1 SEMAINE (D7), 2 SEMAINES (D14), 4 SEMAINES (D28) ET 8 SEMAINES (D56) APRES INFECTION. CHAQUE POINT DE CINETIQUE ET CHAQUE GROUPE DE SOURIS SONT REPRESENTES PAR LA MEDIANE AVEC L'INTERQUARTILE DE N=5 SOURIS. LES STATISTIQUES SONT REALISEES AVEC UN TEST MANN-WHITNEY, AVEC  $^*p<0.05$ . ... 120
- FIGURE 41:** CINETIQUE DE LA REPONSE IGG SERIQUE CONTRE UN LYSAT TOTAL DE *B. PERTUSSIS* CHEZ DES SOURIS (A) BALB/C, (B) C57BL/6 ET (C) PIGR<sup>-/-</sup> INFECTEES AVEC  $10^6$  CFU B1917. LES SOURIS SONT NAÏVES (PBS-BLANC), VACCINEES AVEC INFANRIX<sup>®</sup> HEXA (AP-GRIS) OU SHAN5<sup>®</sup> (WP-NOIR) AVANT D'ETRE INFECTEES PUIS SACRIFIEES A 3H (D0), 1 SEMAINE (D7), 2 SEMAINES (D14), 4 SEMAINES (D28) ET 8 SEMAINES (D56) APRES INFECTION. POUR CHAQUE TEMPS ET GROUPE DE SOURIS N=5. .... 122
- FIGURE 42:** CINETIQUE DE LA REPONSE ANTICORPS DANS LES LAVAGES DE NEZ DES SOURIS C57BL/6 INFECTEES AVEC  $10^6$  CFU B1917. TITRATION DES IGG (A) ET DES IGA (B) CONTRE UN LYSAT TOTAL DE *B. PERTUSSIS*. LES SOURIS SONT NAÏVES (PBS-BLANC), VACCINEES AVEC INFANRIX<sup>®</sup> HEXA (AP-GRIS) OU SHAN5<sup>®</sup> (WP-NOIR) AVANT D'ETRE INFECTEES PUIS SACRIFIEES A 3H (D0), 1 SEMAINE (D7), 2 SEMAINES (D14), 4 SEMAINES (D28) ET 8 SEMAINES (D56) APRES INFECTION. POUR CHAQUE TEMPS ET GROUPE DE SOURIS N=5. .... 122
- FIGURE 43:** PROTOCOLE ET LIGNE DE TEMPS DE VACCINATION, D'INFECTION ET DE PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES DES BABOUINS. 3 BABOUINS ONT ETE VACCINES AVEC  $10^{10}$  CFU BPZE1, 4 BABOUINS AVEC  $10^9$  CFU BPZE1 ET 3 BABOUINS NAÏFS ONT ETE UTILISES POUR CETTE EXPERIENCE. 7 SEMAINES APRES L'ADMINISTRATION DU VACCIN OU DU TAMPON CONTROL, LES 10 BABOUINS ONT ETE INFECTES AVEC  $1.5 \times 10^{10}$  BACTERIES DE LA SOUCHE VIRULENTE D420. CHAQUE SEMAINE POST-INFECTION, SOIT AUX SEMAINES 1 A 4, DES LAVAGES NASOPHARYNGES ET DES PRELEVEMENTS DE SANG ONT ETE REALISES SUR LES BABOUINS. DES ECHANTILLONS DE SANG ONT EGALEMENT ETE PRELEVES JUSTE AVANT LA VACCINATION, ECHANTILLONS PRE-IMMUNS AVANT LE POINT -7 SEMAINE, ET L'INFECTION, ECHANTILLONS PRE-CHALLENGES AVANT LE POINT 0. .... 125
- FIGURE 44:** COURBES REPRESENTATIVES DES TESTS BGIA EFFECTUES SUR LES ECHANTILLONS DE SERA DE BABOUINS. LE BGIA A ETE REALISE SUR LES SERA NON TRAITES (COURBE EN TRAIT PLEIN) ET SUR SERA DECOMPLEMENTES (COURBE EN POINTILLE) DILUE EN SERIE DU  $1/2$  JUSQU'AU  $1/256$ . LES BABOUINS NAÏFS SONT REPRESENTES PAR DES POINTS BLEUS, LES BABOUINS AYANT ETE VACCINES AVEC  $10^9$  CFU BPZE1 PAR DES POINTS VERTS ET LES BABOUINS VACCINES AVEC  $10^{10}$  CFU BPZE1 PAR DES POINTS ROUGES. CHAQUE BABOUIN CORRESPOND A UN SYMBOLE DIFFERENT. LES DIFFERENTS POINTS DE CINETIQUE DE PRELEVEMENTS SANGUINS DONT LES PRE-IMMUNS (A), LES PRE-CHALLENGE (B), 1 SEMAINE (C), 2 SEMAINES (D), 3 SEMAINES (E) ET 4 SEMAINES (F) POST-INFECTION SONT REPRESENTES SUR LE GRAPHIQUE CORRESPONDANT. UN BABOUIN NAÏF EST

MORT ENTRE LA 2 <sup>EME</sup> ET 3 <sup>EME</sup> SEMAINE POST INFECTION. CES GRAPHIQUES REPRESENTENT LA MOYENNE DE 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES.....	127
<b>FIGURE 45:</b> REPRESENTATION DES AIRES SOUS LA COURBE (AUC) DES COURBES DOSES-REponses AU SERUM MESUREES EN BGIA EN FONCTION DU MOMENT DE PRELEVEMENTS DE SANG SUR LES BABOUINS. LES COURBES D'INHIBITION DE CROISSANCE DE <i>B. PERTUSSIS</i> ONT ETE OBTENUES APRES 4H D'INCUBATION AVEC LES SERUMS NON TRAITES, REPRESENTES EN LIGNE PLEINE, OU AVEC LES SERUMS DECOMPLEMENTES, REPRESENTES EN LIGNE POINTILLEE. LES POINTS BLEUS DEFINISSENT LES BABOUINS NAÏFS, LES POINTS VERTS SONT LES BABOUINS VACCINES AVEC 10 <sup>9</sup> CFU BPZE1 ET LES POINTS ROUGES SONT LES BABOUINS VACCINES AVEC 10 <sup>10</sup> CFU BPZE1. LE GRAPHE REPRESENT LA MOYENNE DE 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES. LES STATISTIQUES SONT EFFECTUEES AVEC UN TEST 2-WAY ANOVA POUR MESURE REPETEE AVEC UN POST-TEST DE BONFERRONI. POUR LES COURBES AVEC LES SERUMS DECOMPLEMENTES : -7W (NAÏF VS 10 <sup>9</sup> )* : p<0.01 ; 1W (NAÏF VS 10 <sup>9</sup> )- : p<0.01 ; 1W (NAÏF VS 10 <sup>10</sup> )* : p<0.01 ; 3W (NAÏF VS 10 <sup>9</sup> )- : p<0.05 ; 3W (NAÏF VS 10 <sup>10</sup> )* : p<0.05. POUR LES COURBES AVEC LES SERUMS NON TRAITES : 3W (NAÏF VS 10 <sup>9</sup> )+ : p<0.05 ; 4W (NAÏF VS 10 <sup>9</sup> )+ : p<0.001 ; 4W (10 <sup>9</sup> VS 10 <sup>10</sup> )‡ : p<0.01. ....	129
<b>FIGURE 46:</b> ANALYSE DES AIRES SOUS LA COURBE (AUC) ISSUES DES DOSE-REponse OBTENUS EN BGIA EN FONCTION DU TEMPS ET SELON L'ACTIVITE INHIBITRICE DU SERUM CHAUFFE (A, C, E) ET NON-CHAUFFE (B, D, F) POUR LES 3 GROUPES DE BABOUINS. LES BABOUINS DU GROUPE NAÏF (N=3) N'AYANT PAS ETE VACCINES SONT REPRESENTES EN BLEU (A, B), DU GROUPE AYANT ETE VACCINES AVEC 10 <sup>9</sup> CFU BPZE1 (N=4) EN VERT (C, D) ET AVEC 10 <sup>10</sup> CFU BPZE1 (N=3) EN ROUGE (E, F). LES GRAPHIQUES REPRESENTENT DES TRIPLIQUAS D'EXPERIENCES INDEPENDANTES. LES STATISTIQUES SONT REALISEES AVEC UN TEST MANN-WHITNEY, AVEC * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. ....	131
<b>FIGURE 47:</b> TITRES DES ANTICORPS IGG ET IGA DIRIGES CONTRE L'HEMAGGLUTININE FILAMENTEUSE (FHA), LA TOXINE PERTUSSIQUE (PT) ET LA PERTACTINE (PRN), PRESENTS DANS LE SANG DES BABOUINS AVANT LA VACCINATION (A) ET 3 SEMAINES APRES INFECTION (B). LES 3 BABOUINS DU GROUPE NAÏFS SONT REPRESENTES PAR DES POINTS BLEUS, LES 4 BABOUINS DU GROUPE 10 <sup>9</sup> EN VERT ET LES 3 BABOUINS DU GROUPE 10 <sup>10</sup> EN ROUGE. SOURCE : D'APRES LOCHT ET AL., 2017.....	133
<b>FIGURE 48:</b> CORRELATIONS DES TITRES ANTICORPS IGA ANTI-PRN (PRESENTES DANS LOCHT ET AL., 2017) EN FONCTION DES AIRES SOUS LA COURBE (AUC) CALCULEES EN BGIA A PARTIR DES COURBES DOSES-REponses DE SERUMS NON TRAITEE (NOTE S) OU DECOMPLEMENTE (NOTE SHI). LES GRAPHES REPRESENTENT LA CORRELATION DU TITRE IGA SERIQUE AVEC LES AUC DES BGIA SUR SERUM (A) ET SERUM DECOMPLEMENTE (B) 3 SEMAINES POST-INFECTION ET SUR SERUM (C) ET SERUM DECOMPLEMENTE (D) 4 SEMAINES POST-INFECTION SUR LES 4 BABOUINS VACCINES AVEC 10 <sup>9</sup> CFU BPZE1. LA DROITE DE REGRESSION LINEAIRE EST INDIQUEE SUR CHAQUE GRAPHE AVEC LA REPRESENTATION EN POINTILLEE DE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 95%. POUR (A) R <sup>2</sup> =0.87, POUR (B) R <sup>2</sup> =0.79, POUR (C) R <sup>2</sup> =0.01 ET POUR (D) R <sup>2</sup> =0.95. ....	133
<b>FIGURE 49:</b> TITRATION PAR ELISA DES IGG SERIQUES TOTAUX CONTRE L'HEMAGGLUTININE FILAMENTEUSE (FHA) EN BLEU FONCE, LA PERTACTINE (PRN) EN VERT, LA TOXINE PERTUSSIQUE (PT) EN ROUGE ET UN LYSAT TOTAL DE <i>B. PERTUSSIS</i> EN BLEU CLAIR. L'ECHELLE DE TITRATION EST EXPRIMEE EN LOGARITHME EN BASE 10. ND=NON DETERMINE. ....	138
<b>FIGURE 50:</b> REPRESENTATION DES TITRES ELISA D'IGG TOTAUX SERIQUES AVANT (PHE2, PHE1, PHE5) ET APRES (PHE4, PHE6, PHE3) REVACCINATION AVEC LE VACCIN ACELLULAIRE BOOSTRIX <sup>®</sup> POUR LES ECHANTILLONS PHE2/PHE4 ET PHE1/PHE6 OU REPEVAX <sup>®</sup> POUR LES ECHANTILLONS PHE5/PHE3. LES TITRES ANTI-FHA (BLEU FONCE), ANTI-PRN (VERT), ANTI-PT (ROUGE) ET ANTI-LYSAT DE <i>B. PERTUSSIS</i> (BLEU CLAIR) SONT REPRESENTES EN ECHELLE LOGARITHMIQUE EN BASE 10. ....	138
<b>FIGURE 51:</b> COURBES D'INHIBITION DE CROISSANCE DE BPSM APRES INCUBATION AVEC DES ECHANTILLONS SERIQUES HUMAINS, NOTES PHE1 (A), PHE2 (B), PHE3 (C), PHE4 (D), PHE5 (E) ET PHE6 (F). LA SURVIE BACTERIENNE A ETE EVALUEE APRES 4H D'INCUBATION AVEC LES SERA NON TRAITES, COURBES S AVEC DES CERCLES NOIRES, OU LES SERA DECOMPLEMENTES, COURBES SHI AVEC DES CERCLES BLANCS, OU LES SERA RECOMPLEMENTES, COURBES SHIC <sub>2.5</sub> AVEC DES CERCLES NOIRS ET BLANCS. LA DECOMPLEMENTATION S'EST EFFECTUEE A 56°C PENDANT 30 MIN ET LA RECOMPLEMENTATION AVEC 2.5% DE SERUM HUMAIN DEplete EN IGG ET IGM. CES GRAPHES REPRESENTENT LA MOYENNE DE 3 EXPERIENCES INDEPENDANTES REALISEES EN TRIPLICA. LES ECARTS STANDARDS SONT SPECIFIES EN ROUGE POUR CHAQUE POINT DE DILUTION DU SERUM EFFECTUE ET LA SURVIE BACTERIENNE EST EXPRIMEE EN POURCENTAGE APRES NORMALISATION. LES COURBES S ET SHI ONT ETE NORMALISEES SUR LE MAXIMUM DE CROISSANCE OBSERVABLE APRES 4H D'INCUBATION DES BACTERIES DANS LE MILIEU DE DILUTION DES SERA ET DES BACTERIES (MILIEU DE CULTURE SS) ET LA COURBE SHIC <sub>2.5</sub> A ETE NORMALISEE PAR RAPPORT A L'ACTIVITE INHIBITRICE DE LA SOURCE DE COMPLEMENT SEULE SUR LES BACTERIES APRES 4H D'INCUBATION .....	140
<b>FIGURE 52:</b> REPRESENTATION DES ID50 CALCULES PAR BGIA POUR LES ECHANTILLONS DE SERA (FLECHE VIOLETTE) ET DE SERA RECOMPLEMENTE (FLECHE BLEUE) POUR LES PAIRES DE SERA. ....	141
<b>FIGURE 53:</b> CORRELATION DES TITRES IGG TOTAUX, DETERMINES PAR ELISA, EN FONCTION DES ID50 D'INHIBITION DE CROISSANCE, DETERMINES PAR BGIA, SUR LES ECHANTILLONS DE SERA HUMAINS. LES TITRES D'IGG ANTI-FHA (ROND BLEU FONCE), ANTI-PRN (CARRE VERT), ANTI-PT (TRIANGLE ROUGE) ET ANTI-LYSAT TOTAL (TRIANGLE INVERSE BLEU CLAIR) SONT REPRESENTES SELON LES ID <sub>50</sub> DES BGIA OBTENUES AVEC LES SERUMS COMPLETS (A) OU LES SERA RECOMPLEMENTES (B) AVEC 2.5% DE SERUM HUMAIN DEplete EN IGG ET IGM. UNE DROITE DE REGRESSION LINEAIRE (R <sup>2</sup> =0.88, P=0.0084) EST REPRESENTEE ENTRE LE TAUX D'IGG ANTI-PRN ET LES VALEURS ID <sub>50</sub> DU BGIA SUR SERUM RECOMPLEMENTE, AINSI QUE LA DEVIATION DE CETTE DROITE EN LIGNE POINTILLEE. ....	142

**FIGURE 54:** LIGNE DE TEMPS SUIVIE POUR LES IMMUNISATIONS ET LES PRELEVEMENTS DE SANG. LE GROUPE AP ET WP REGROUPENT DES ENFANTS DONT LA MERE A ETE REVACCINEE PENDANT LE DERNIER TRIMESTRE DE GROSSESSE (FLECHE ROUGE) AVEC LE VACCIN ACELLULAIRE BOOSTRIX(R), ET QUI ONT ETE VACCINES SOIT AVEC LE VACCIN ACELLULAIRE INFANRIX® (AP) SOIT AVEC LE VACCIN CELLULAIRE QUINVAXEM® (WP). LE GROUPE EPI WP REPRESENTE DES ENFANTS DONT LA MERE N'A PAS ETE REVACCINEE PENDANT LA GROSSESSE ET QUI ONT ETE VACCINES AVEC LE VACCIN QUINVAXEM®. LES ENFANTS ONT ETE VACCINES SELON LE CALENDRIER VACCINAL EN RIGUEUR EN THAÏLANDE, L'IMMUNISATION PRIMAIRE (FLECHE ROSE FONCE) A EU LIEU A 2 MOIS, 4 MOIS ET 6 MOIS, ET L'IMMUNISATION SECONDAIRE A 18 MOIS (FLECHE ROSE CLAIR). LES PRELEVEMENTS DE SANG (FLECHE BLEUE) ONT EU LIEU AU MOIS 0, LORS DE L'ACCOUCHEMENT POUR RECUPERER DU SANG MATERNEL ET OMBILICAL ; A 2 MOIS, AVANT LA PREMIERE INJECTION DE VACCIN ; A 7 MOIS, SOIT 1 MOIS APRES LA FIN DE L'IMMUNISATION PRIMAIRE ; A 18 MOIS, JUSTE AVANT L'IMMUNISATION SECONDAIRE ; ET A 19 MOIS, SOIT 1 MOIS APRES LE RAPPEL. .... 180

## Table des matières

I.	Bordetella pertussis, agent étiologique de la coqueluche .....	1
A.	Les origines de <i>Bordetella</i> .....	1
1.	Histoire de la maladie et du pathogène .....	1
2.	Phylogénie des <i>Bordetella</i> .....	2
B.	Manifestations de la coqueluche .....	3
1.	Symptomatologie .....	3
2.	Epidémiologie et surveillance .....	5
3.	Prophylaxie et prévention.....	6
4.	Diagnostic et traitements .....	8
II.	Pathogénie de la coqueluche .....	10
A.	Facteurs de virulence et régulation.....	10
1.	Régulation de la virulence.....	11
2.	Facteurs de virulence : les toxines .....	13
3.	Facteurs de virulence : les adhésines .....	15
4.	Autres facteurs .....	17
5.	Résumé.....	18
B.	Réponse immunitaire.....	19
1.	Modulation de la réponse immunitaire après infection .....	19
a.	Réponse cellulaire .....	19
b.	Réponse humorale .....	21
2.	Modulation de la réponse immunitaire après vaccination .....	22
a.	Réponse cellulaire .....	22
b.	Réponse humorale .....	23
C.	Modèles animaux de la coqueluche .....	25
III.	La réponse immunitaire humorale adaptative: les anticorps .....	26
A.	Découverte des anticorps et de leurs fonctions .....	26
B.	Le répertoire des anticorps .....	28
1.	Structure et propriétés des anticorps .....	28
a.	Structure d'un monomère .....	28
b.	Isotypes, idiotypes et allotypes.....	30

c.	Caractéristiques des isotypes et propriétés fonctionnelles.....	32
2.	Expression génétique des immunoglobulines .....	37
a.	Recombinaison somatique des gènes V(D)J .....	37
b.	Hypermutations somatiques et maturation d'affinité.....	37
c.	Commutation isotypique .....	37
d.	Modifications post-traductionnelles des anticorps : la glycosylation .	38
3.	Complexe immunitaire et amplitude de la réponse immunitaire .....	39
a.	Interaction antigène-anticorps .....	39
b.	Réponse primaire et secondaire, notion de mémoire immunitaire....	40
C.	Fonctions effectrices des anticorps .....	41
1.	Activité dépendante des interactions avec le récepteur des anticorps .	41
a.	Les récepteurs FcR.....	41
b.	Activité biologique de la liaison FcR-Fc .....	43
2.	Activité anticorps dépendante du complément .....	44
3.	Activité anticorps indépendante de cellules et molécules effectrices ...	44
IV.	Problématiques et objectifs de la thèse .....	47
V.	Mise en place d'un nouveau test d'étude de la fonctionnalité des anticorps.	48
A.	Publication - Développement et standardisation d'un test d'inhibition de croissance de <i>Bordetella pertussis</i> à haut débit .....	48
B.	Résumé de publication.....	74
C.	Résultats complémentaires – la recombinaison.....	77
1.	Matériel et méthodes .....	78
2.	Résultats .....	79
D.	Bilan sur le BGIA et l'activité <i>in vitro</i> du complément .....	83
VI.	Etude de la spécificité structurelle et fonctionnelle d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes majeurs de <i>B. pertussis</i> .....	84
A.	Matériel et méthodes .....	84
B.	Caractérisation de la structure des mAbs anti-FHA et de la liaison FHA - mAbs anti-FHA .....	90
C.	Activité fonctionnelle des mAb anti-FHA <i>in vitro</i> .....	99
D.	Activité <i>in vivo</i> des mAbs dans la protection contre une infection à <i>B. pertussis</i> .....	103
E.	Bilan sur l'étude des mAbs anti-FHA .....	104

VII.	Etude de la réponse anticorps dans le modèle souris .....	105
A.	Matériel et méthodes .....	105
B.	Transfert passif de séra issus de souris naïves ou immunisées avec un vaccin aP ou un vaccin wP précédent une infection à <i>B. pertussis</i> .....	108
C.	Infection de souris naïves ou préalablement immunisées avec un vaccin aP ou un vaccin wP : étude de la réponse anticorps.....	112
1.	Cinétique de colonisation .....	113
2.	Etude de la réponse anticorps .....	121
D.	Bilan sur le rôle des anticorps dans les contextes d'immunisation passive et active.....	123
VIII.	Etude de la réponse anticorps dans le modèle babouin.....	124
A.	Etude de la fonctionnalité des anticorps induits vaccination à BPZE1 .....	124
1.	Matériel et méthodes .....	124
2.	Analyse des échantillons par BGIA.....	126
3.	Résumé sur l'activité BGIA.....	132
B.	Relation entre les effets inhibiteurs du sérum et les différents isotypes d'anticorps présents.....	133
C.	Bilan de l'étude sur la fonctionnalité des anticorps sériques.....	134
IX.	Etude de la réponse anticorps dans le modèle humain.....	135
A.	Analyse sur un petit échantillon de sérums humains appariés avant et après un rappel vaccinal contre la coqueluche.....	135
1.	Matériel et méthodes .....	135
2.	Résultats.....	137
a.	Dosage de la réponse anticorps par ELISA .....	137
b.	Test d'inhibition de croissance des échantillons en BGIA.....	139
c.	Corrélation entre titre anticorps et fonction inhibitrice : ELISA versus BGIA.....	141
3.	Bilan de l'étude sur la fonctionnalité des anticorps post-vaccination aP chez des adultes .....	142
B.	Etude qualitative et quantitative de la réponse humorale mère-enfant dans le cadre d'immunisation maternelle.....	143
1.	Publication - Quantité et qualité des anticorps après vaccins anticoquelucheux, acellulaires versus à cellules entières, chez les nourrissons nés de mères ayant reçu le Tdap pendant la grossesse : essai randomisé. ..	143
2.	Résumé de publication .....	179

X.	Discussion et perspectives .....	181
A.	Développement d'un outil fonctionnel : le BGIA .....	181
B.	Lien entre structure-fonction-protection : étude des mAbs anti-FHA .....	184
C.	La souris : un modèle classique .....	185
D.	Le babouin : un modèle émergent .....	187
E.	L'Homme : un modèle unique .....	187
F.	Ouverture du projet de thèse .....	189
XI.	Bibliographie.....	190
XII.	Annexes .....	208
A.	Annexe 1.....	208
B.	Annexe 2.....	216

## **Introduction**

# ***1. Bordetella pertussis, agent étiologique de la coqueluche***

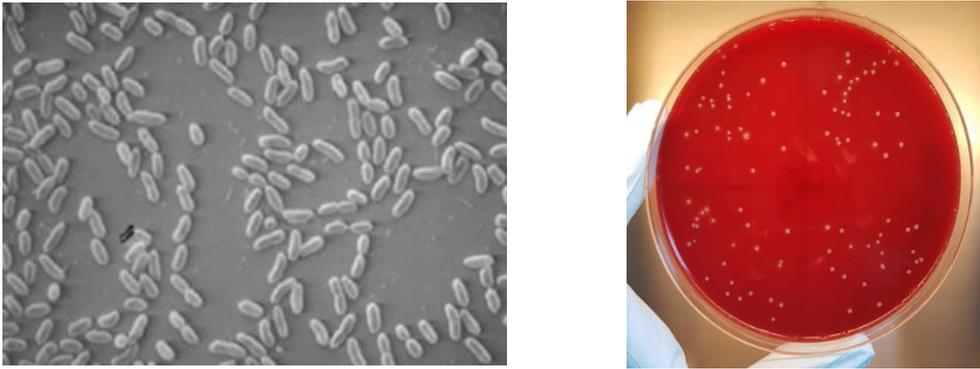
## **A. Les origines de *Bordetella***

### **1. Histoire de la maladie et du pathogène**



**Figure 1:** Portraits (de gauche à droite) de Guillaume de Baillou, médecin français du 16<sup>ème</sup> et début 17<sup>ème</sup> siècle ayant décrit la coqueluche ; et de Jules Bordet accompagné d'Octave Gengou, microbiologistes belges du 19<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> siècle ayant isolés la bactérie responsable de la coqueluche.

Même si l'époque et le lieu d'apparition des premiers cas de coqueluche sont mal connus, certaines descriptions symptomatiques de la maladie en Europe remontraient au temps d'Hippocrate, 4<sup>ème</sup> siècle avant J.-C. Malgré certaines mentions de « kinkehost » au 12<sup>ème</sup> siècle en Angleterre, ce n'est qu'en 1578 à Paris, que Guillaume de Baillou (**Fig.1**) décrit une épidémie de toux quinteuse, « tussis quintina » et remarqua notamment que les enfants en bas âges étaient particulièrement touchés, suggérant ainsi une forme d'immunisation chez les adultes. C'est en 1679 que Sydenham parle de la maladie en tant que « pertussis », toux violente en latin. D'autres épidémies frappent l'Europe du 17<sup>ème</sup> au 19<sup>ème</sup> siècle avec différentes appellations de la maladie « chincough » en Angleterre, « tosse canina » en Italie, « wolfshusten » en Allemagne, ou même la « toux des 100 jours » en Chine<sup>1</sup>. L'appellation coqueluche est donnée suite au son particulier émis lors d'une reprise de respiration entre deux quintes de toux, semblable au chant du coq.



**Figure 2:** Images de *B. pertussis*. De gauche à droite, vu des coccobacilles par microscopie électronique à balayage (d'après Conover et al., 2012) et des colonies isolées en gouttelettes de mercure après 5 jours d'incubation sur boîte sang Bordet-Gengou.

Ce n'est qu'en 1900, que Jules Bordet et Octave Gengou (**Fig.1**), observant au microscope les expectorations d'un nouveau-né, identifient le pathogène responsable de la coqueluche. Ce coccobacille (**Fig.2**) d'une taille de 0.5  $\mu\text{m}$  à 1  $\mu\text{m}$ , aérobic stricte, encapsulé et non-sporulant à Gram négatif fut définitivement isolé en 1906<sup>2,3</sup> sur un milieu de culture solide appelé aujourd'hui milieu Bordet-Gengou. Sur ce milieu, les colonies de ces bacilles sont visibles après 4 à 5 jours d'incubation à 37°C avec un aspect de gouttelettes de mercure (**Fig.2**). La bactérie fut d'abord nommée *Haemophilus pertussis* en lien avec ses caractéristiques communes au bacille de Pfeiffer, *Haemophilus influenzae*. Puis, elle fut renommée *Bordetella pertussis* en 1952 avec la description du genre *Bordetella* par Moreno-López et en hommage aux travaux de J. Bordet. Ce dernier reçut le prix Nobel de médecine en 1919 pour ses découvertes en immunologie, notamment pour ses travaux sur le rôle des anticorps, appelés ambocepteurs par P. Ehrlich, et du complément, appelé alexine.

## 2. Phylogénie des *Bordetella*

Le genre *Bordetella* comprend des espèces environnementales et pathogènes humaines et vétérinaires causant une variété de maladies respiratoires dont la coqueluche. Ce genre appartient à la classe des  $\beta$ -*proteobacteria* et comprend à ce jour 16 espèces. Parmi elles, les 3 « classiques » sont (1) *Bordetella bronchiseptica*, isolée au début du 20<sup>ème</sup> siècle, responsable d'infections pulmonaires chroniques, asymptomatiques ou sévères de nombreux mammifères et occasionnellement l'Homme ; (2) *B. pertussis*, responsable de la coqueluche et pathogène strictement adapté à l'Homme et (3) *Bordetella parapertussis*, divisée en une lignée isolée en 1930 et responsable d'une coqueluche modérée chez l'Homme et une lignée ciblant

les ovins<sup>4</sup>. *Bordetella holmesii*<sup>5</sup>, isolée en 1983, cause des symptômes relatifs à la coqueluche et est souvent associée à des co-infections avec *B. pertussis*. *Bordetella pseudohinzii*<sup>6</sup> est un pathogène respiratoire isolé de souris de laboratoire, alors que *Bordetella hinzii*<sup>7</sup> est un pathogène à cible aviaire, comme *Bordetella avium*<sup>8</sup>. Ces 2 dernières espèces ont néanmoins été retrouvées chez des patients<sup>9,10</sup> atteints de mucoviscidose tout comme *Bordetella sputigena*, *Bordetella flabilis* et *Bordetella bronchialis*<sup>11</sup>, isolées aux début des années 2000. *Bordetella ansorpii*<sup>12</sup> et *Bordetella trematum*<sup>13</sup> sont quant à elles 2 espèces ne ciblant pas le tractus respiratoire mais des plaies. *Bordetella petrii*<sup>14</sup> est la première espèce environnementale, isolée d'un bioréacteur, du genre *Bordetella* capable de croître dans des conditions anaérobies qui a été également retrouvée chez l'Homme<sup>15</sup>, soulignant le caractère opportuniste de ce micro-organisme. Enfin, *Bordetella muralis*, *Bordetella tumbae* et *Bordetella tumulicola*<sup>16</sup> sont les 3 seules espèces uniquement environnementales identifiées en 2015 sur des peintures murales d'une chambre funéraire datant de plus de 1300 ans au Japon. Ces découvertes confortent l'antériorité phylogénétique<sup>17</sup> des espèces environnementales des *Bordetelles* et l'apparition successive d'espèces pathogènes adaptées aux animaux et une spéciation particulière de *B. pertussis* pour l'Homme.

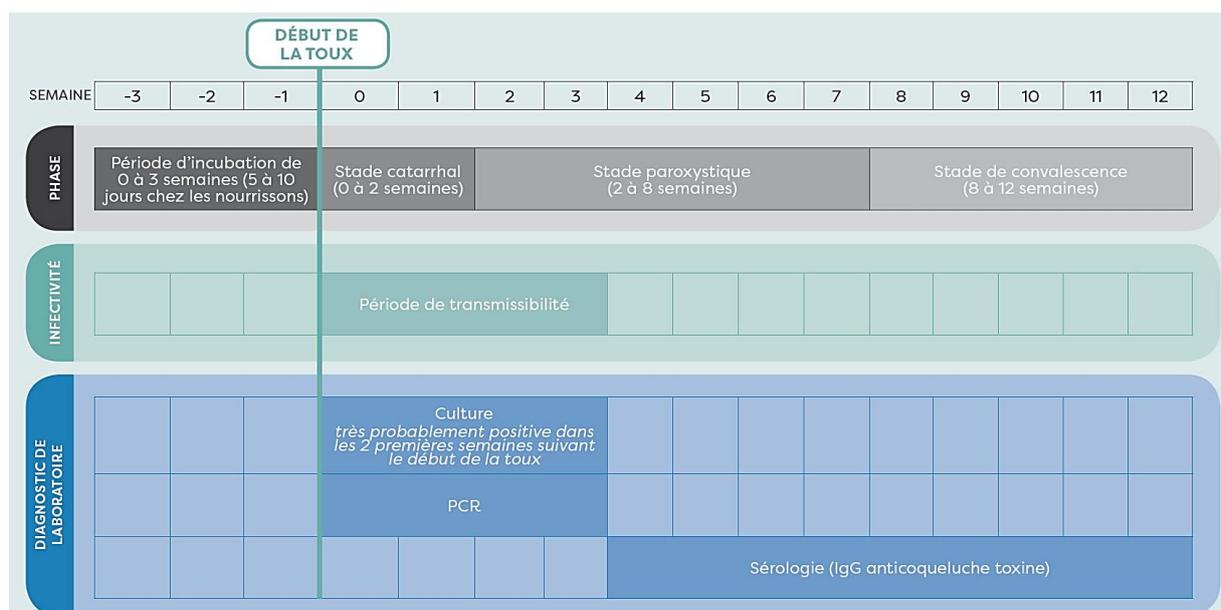
## **B. Manifestations de la coqueluche**

### **1. Symptomatologie**

La coqueluche est une maladie infectieuse des voies respiratoires dont le taux de transmission est très élevé, 1 personne infectée en contaminerait 15 en moyenne selon l'INSERM. Le risque de transmissibilité de la maladie peut atteindre 90% pour les individus non-immunisés en contact avec des individus infectés. La transmission se fait par voie aérienne de particules aérosolisées et chargées en sécrétions mucoales infectées<sup>18</sup>. Les muqueuses respiratoires de l'Homme sont l'habitat naturel de *B. pertussis* et *B. parapertussis* et les infections sont rarement disséminées au-delà de l'appareil respiratoire<sup>19</sup>. Une fois les particules inhalées, les bactéries migrent dans le nasopharynx et la trachée et produisent différents facteurs de virulence précoces dont des adhésines, comme l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) et les fimbriae (Fim) pour coloniser la muqueuse respiratoire ciliée. Les bactéries prolifèrent ensuite et secrètent des toxines, telles que la toxine pertussique (PTX) et la toxine adénylate cyclase (ACT), qui permettent de moduler la réponse immunitaire et d'échapper aux défenses immunitaires locales et systémiques. La clairance du pathogène coïncide avec la mise en place d'une

réponse immunitaire adaptative, néanmoins les symptômes peuvent persister à cause de la diffusion des nombreuses toxines, dont notamment PTX.

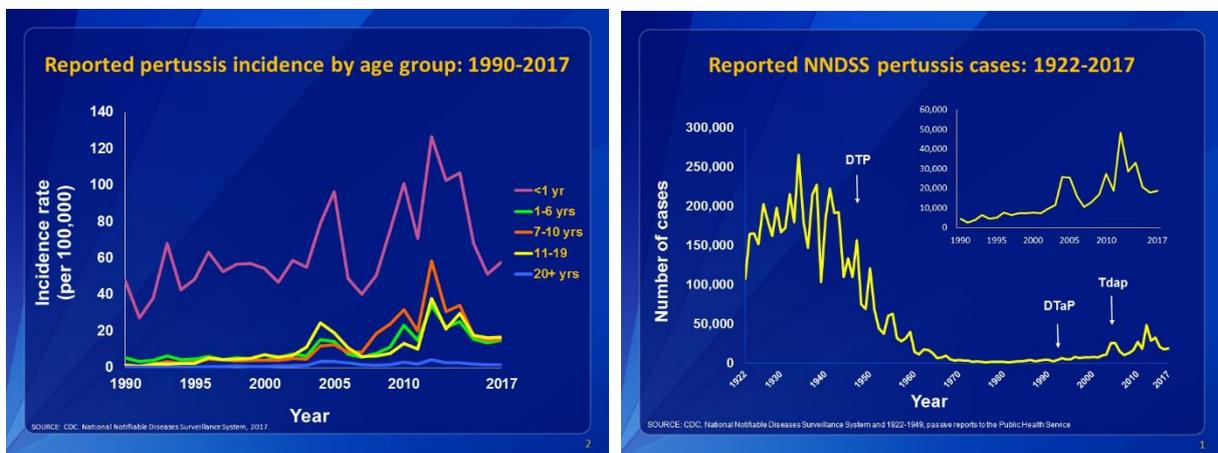
La maladie se manifeste selon trois stades caractéristiques (**Fig.3**) suivant une période d'incubation asymptomatique de 5 à 10 jours et n'est généralement pas associée à des épisodes fiévreux. Le premier, le stade catarrhal dure de 1 à 2 semaines et correspond à la colonisation et la production des facteurs de virulence par le pathogène. Ce stade se manifeste par des rhinorrhées et des épisodes de toux, semblables à un rhume, dus à une réaction inflammatoire locale. C'est lors de cette phase que les individus infectés sont le plus contagieux (**Fig.3**) et donc susceptibles de transmettre la coqueluche. Ensuite, vient le stade paroxystique qui dure généralement 6 semaines mais peut persister jusqu'à 10 semaines. Ce stade est marqué d'une part, par une leucocytose et une lymphocytose et d'autre part, par des quintes de toux sévères et prolongées avec une reprise de la respiration difficile. Ces quintes sont souvent accompagnées de vomissements, d'accès de cyanose et d'épisodes d'apnées. Chez les plus jeunes, moins d'un an, les conséquences de la toux peuvent être graves avec des atteintes sévères, comme des pneumonies, des fractures de côtes, des crises convulsives ou une encéphalopathie aigue nécessitant une hospitalisation. En absence de traitement antibiotique pris à temps, la mort peut survenir chez les nourrissons. Cette toux se déclare jusqu'à 15 attaques par jour et se produit le plus souvent la nuit. Enfin pendant le stade de convalescence, la toux devient moins fréquente et moins intense jusqu'à un retour à la normale. Ce stade peut se prolonger sur plusieurs mois. Il est à noter que selon l'état immunitaire et vaccinal des malades, les symptômes peuvent varier.



**Figure 3:** Echancier (en semaines) des différentes phases de la coqueluche, de la période d'infectivité et des tests diagnostics de laboratoire. Source : Rapport 2018 de l'OMS sur la coqueluche.

## 2. Epidémiologie et surveillance

L'OMS estime entre 20 à 40 millions le nombre de nouveaux cas de coqueluche par an avec 200.000 à 400.000 cas fatals annuels, dont 160.700 cas sont associés à des enfants, dont l'âge est inférieur à 5 ans<sup>20</sup>. Il existe néanmoins une disparité entre le nombre de cas rapportés et les estimations établies car la coqueluche est peu surveillée et n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. En France, la déclaration obligatoire n'existe plus depuis 1986, mais un réseau hospitalier pédiatrique, RENACOO, recense les cas de coqueluche. Entre 1996 et 2013, le réseau a identifié plus de 3000 cas de coqueluche chez les enfants <6 mois dont la contamination provenait essentiellement de la fratrie ou des parents et représentent 64% des cas totaux.



**Figure 4:** Données de surveillance des cas de coqueluche aux Etats-Unis par le Centre de contrôle des maladies (CDC). A gauche, l'incidence des cas reportés de coqueluche par catégorie d'âge entre 1990 et 2017. A droite, le nombre de cas de coqueluche reportés entre 1922 et 2017 avec indication de l'introduction du vaccin cellulaire (DTP) et des vaccins acellulaires (DTaP et Tdap). Source : CDC

C'est une maladie endémique dans tous les pays avec néanmoins 90% des cas recensés de coqueluche dans les pays en développement. La coqueluche produit des cycles épidémiques de 3 à 5 ans (**Fig.4**). Pendant l'ère pré-vaccinale, la coqueluche se transmettait de façon horizontale entre enfants de 1 à 9 ans alors que de nos jours, la transmission est plutôt verticale et s'opère d'adultes et adolescents vers les très jeunes enfants<sup>21</sup>. Les coqueluches adultes sont peu voire mal diagnostiquées, ce qui fait des adultes et des adolescents un nouveau réservoir de transmission. Ce changement de réservoir dans des pays où le taux de vaccination avoisine les 90% (**Fig.4**) serait expliqué par une diminution d'efficacité dans le temps de l'immunité induite par la vaccination<sup>22</sup>.

Globalement, les causes de la recrudescence de la coqueluche seraient multiples. Hormis l'utilisation d'outils diagnostics plus performants, une surveillance accrue de la maladie et une meilleure vigilance de la part des médecins,

une hypothèse sur l'adaptation génétique des souches circulantes à la pression vaccinale pourrait être une explication de cette augmentation de nombre de cas de coqueluche. En effet, la diversité génétique observable pendant l'ère pré-vaccinale et post-vaccinale est associée avec un polymorphisme des antigènes PTX et pertactine (PRN)<sup>22-24</sup>, composants majeurs des vaccins acellulaires (aP). Une autre cause pourrait être la circulation silencieuse du pathogène au sein de la population vaccinée avec les vaccins aP. Cela a été illustré dans un modèle d'étude utilisant des babouins. Ce modèle a permis de montrer que les vaccins aP protègent contre la maladie, soit les symptômes, mais pas contre l'infection, ni contre la transmission du pathogène<sup>25</sup>.

### 3. Prophylaxie et prévention

Avec le développement de vaccins à germes entiers inactivés dit cellulaires, wP, dans les années 1940, de nombreux pays ont adopté la vaccination en prévention de la coqueluche. Ces vaccins sont composés de *B. pertussis* inactivée par la chaleur ou par la formaline et sont combinés au vaccin contre la diphtérie et le tétanos. Malgré la diminution du nombre de cas de coqueluche recensés (**Fig.4**) et l'efficacité du vaccin à protéger contre les symptômes de la maladie, des doutes quant à l'aspect sécuritaire et la forte réactogénicité occasionnelle du vaccin (inflammation locale, douleur, fièvre, irritation) ont mené certains pays, comme la Suède, à stoppé les campagnes de vaccination obligatoire en 1979.

Dans l'optique de développer des vaccins moins réactogène<sup>26</sup>, une seconde génération de vaccins, les vaccins aP, ont été mis au point dans les années 1970 au Japon avec des antigènes purifiés de *B. pertussis*. Ces vaccins acellulaires sont également combinés aux vaccins contre la diphtérie et le tétanos et le nombre d'antigènes de *B. pertussis* présents dans la composition peut varier de 1 à 5 (PTX, FHA, PRN, FIM2, FIM3). Des études comparatives sur la composition optimale des vaccins aP ont montré que les vaccins composés de PTX et FHA étaient plus efficaces que les vaccins contenant seulement la PTX, mais moins efficace que les vaccins trivalents composés de PTX, FHA et PRN ou pentavalents avec l'association des FIM<sup>27</sup>. De nombreux pays, dont les pays fortement industrialisés, ont adopté les vaccins acellulaires dans les années 1990 et début 2000, comme la plupart des pays Européens, y compris la France, les Etats Unis d'Amérique, le Canada, l'Australie, le Japon. En raison des coûts de fabrication des vaccins acellulaires, des pays à faibles ressources utilisent toujours les vaccins à germe entiers.

L'OMS recommande d'administrer 3 doses de vaccin anticoquelucheux pour les enfants de <1 an et une dose de rappel entre 1 et 6 ans. Dans certains pays, des deuxièmes et troisièmes doses de rappel sont prévues pour les adolescents et

jeunes adultes. Une dose pour les femmes enceintes et l'entourage (stratégie du cocooning) d'un nouveau-né est recommandée afin de transmettre passivement par le placenta et l'allaitement les anticorps maternels. En France, les recommandations pour une vaccination optimale sont 3 doses de vaccin acellulaire à 2, 4 et 11 mois, puis 3 rappels à 6 ans, entre 11 et 13 ans et à 25 ans.

L'immunisation globale de la population a réduit de plus de 90% les cas reportés de coqueluche (**Fig.4**). Le taux de vaccination globale de la coqueluche est estimé à plus de 90% dont 86% de la population mondiale ayant reçu une vaccination optimale (3 doses). Afin de solutionner le problème de recrudescence mondiale de la coqueluche, diverses stratégies ont été mises en place<sup>28</sup>, comme l'augmentation du nombre de rappel de vaccination, la vaccination maternelle, la stratégie cocooning ou la formulation de nouveaux vaccins (vaccins wP moins réactogènes, nouveaux antigènes protecteurs dans les vaccins aP, ajout d'adjuvants plus performants, utilisation de nouvelles souches vaccinales ou développement de vaccins vivants à administration nasale<sup>29</sup>).

La stratégie du cocooning est venue du constat que les nouveau-nés et jeunes enfants étaient essentiellement contaminés au sein de la même famille<sup>30,31</sup> et que la revaccination de l'entourage, surtout les parents et la fratrie, pourrait réduire le taux de transmission. Néanmoins, les conclusions d'études de cas sont discutées lorsque certaines montrent qu'il n'y a aucune réduction sur le nombre de cas reportés de coqueluche chez les enfants de moins de 6 mois d'âge<sup>32</sup>, d'autres constatent une réduction de moitié du nombre de cas confirmés chez les enfants de moins de 4 mois<sup>33</sup>. La vaccination maternelle anti-pertussique, comme stratégie d'immunisation anténatale<sup>34</sup>, est réalisée pendant le dernier trimestre de grossesse, entre les semaines 27 et 36. Cela induit une forte concentration d'anticorps anti-toxine et anti-adhésine dans le sang de cordon et chez le nouveau-né<sup>35</sup> capable de protéger l'enfant en attendant la vaccination complète. Cependant des questions quant à une interférence possible entre les anticorps maternels transmis et les anticorps de l'enfant induit après la vaccination révèlent effectivement une baisse de la concentration totale en anticorps anti-toxine<sup>36</sup> ou anti-adhésine<sup>37</sup> après la vaccination optimale avec aP chez l'enfant. Il a été également montré, dans une étude en modèle souris, une diminution de l'activité protectrice des anticorps maternels et des anticorps des enfants suite à la vaccination aP<sup>38</sup> suggérant une interférence fonctionnelle sur les propriétés effectrices des anticorps induits et transmis. La vaccination néonatale a également fait l'objet de recherche et semble protégeait les babouins nouveau-nés contre les symptômes de la coqueluche suite à une infection<sup>39</sup> précoce. Néanmoins, la vaccination aP pourrait interférer avec la réponse anticorps médiée par les autres composants du vaccin acellulaire<sup>40</sup>. L'implémentation de ce type d'immunisation précoce nécessite davantage de recherches pour en déterminer l'impact à long terme sur la réponse mémoire des lymphocytes.

D'autres stratégies ont été mises en place pour maximiser les effets des vaccins actuels, augmentation du nombre de rappel vaccinal, modification de la composition ou optimisation de la formulation. Suite à la perte d'efficacité des vaccins aP dans le temps, les institutions de santé ont préconisé des doses de rappel plus fréquentes. Et malgré une augmentation relative du taux d'anticorps<sup>26</sup> et une meilleure activité opsonisante des anticorps induits<sup>41</sup> suivant le rappel, il a été constaté une augmentation du taux d'anticorps IgE anti-toxine pertussique localement<sup>42</sup> et une susceptibilité accrue aux infections coquelucheuses<sup>43</sup>. En parallèle, de nombreuses études sur la recherche de nouveaux antigènes protecteurs ont permis de montrer l'importance des autotransporteurs (SphB1, Vag8, BrkA)<sup>44,45</sup> de *B. pertussis* pour susciter la production d'anticorps opsonisants protecteurs. En parallèle, l'utilisation de l'alun comme adjuvant dans les vaccins aP est connu pour orienter la réponse cellulaire vers un profil Th2, alors que l'infection naturelle à *B. pertussis* génère un profil Th1/Th17. C'est pourquoi, l'utilisation d'adjuvant comme les oligodéoxynucléotides CpG<sup>46</sup> reconnu par les TLR9 ou des agonistes TLR7<sup>47</sup> ont été étudiés comme inducteur de profil Th1/Th17, toutefois sans aboutir à un développement clinique. En outre, le développement d'un vaccin cellulaire moins réactogène, avec une concentration en endotoxine plus faible (Plow)<sup>48</sup>, a montré une efficacité semblable aux wP commerciaux et a été élaborée comme alternative économique pour les pays à faibles revenus.

Enfin, le développement de nouveaux candidats vaccins est réfléchi afin de mimer davantage l'infection naturelle pour induire les mécanismes protecteurs liés à une protection efficace et durable. L'immunisation mucosale et la formulation de souches vaccinales vivantes atténuées semblent donc être des alternatives pertinentes. Actuellement en essai clinique de phase 2, la souche vaccinale BPZE1<sup>29</sup> est non-pathogénique et non-inflammatoire chez l'Homme<sup>49</sup> et induit une réponse cellulaire Th1/Th17<sup>50</sup>. La vaccination à BPZE1 protège à long terme contre la maladie et contre l'infection dans le modèle murin<sup>51</sup> et babouin<sup>52</sup> et présente des propriétés anti-inflammatoires diverses<sup>53</sup>.

#### **4. Diagnostic et traitements**

Le diagnostic est confirmé après une mise en culture des bactéries issues de prélèvements nasopharyngés, amplification et vérification du matériel génétique ou présence de marqueur sérologique<sup>54</sup>. Le choix de la technique de diagnostic dépend essentiellement de la phase de la maladie. Si la durée des épisodes de toux est inférieure à 15 jours, le diagnostic se fait par culture ou RT-PCR. Pour une toux qui date de moins de 3 semaines, le diagnostic se fait également par RT-PCR. Les PCR se réalisent sur des séquences d'insertion (IS481) et sur des promoteurs spécifiques (PTX P1 ou P3) de *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. holmesii*. Enfin si la

toux est persistante et supérieure à 3 semaines, la recherche d'anticorps sériques dirigés contre des marqueurs de *B. pertussis* (IgG- et IgA-PTX) validera l'infection à *B. pertussis* uniquement (**Fig.3**). La séroconversion est confirmée après comparaison de 2 échantillons sériques prélevés à 3-4 semaines d'intervalle.

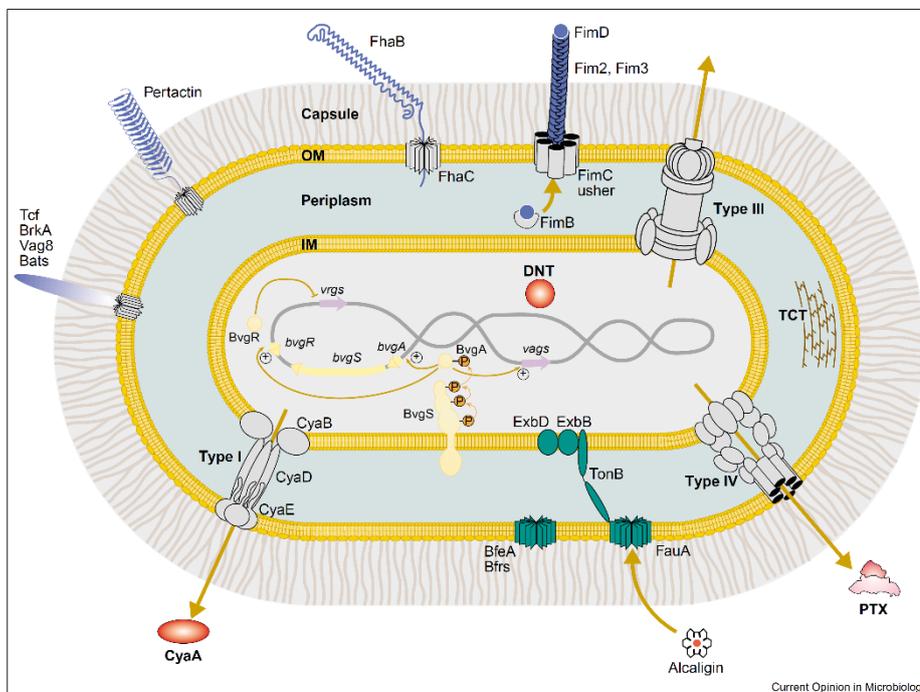
Le traitement par antibiotiques préconisé est l'antibiothérapie par macrolides. Historiquement, l'utilisation de l'érythromycine s'est vu remplacée par l'azithromycine et la clarithromycine<sup>55</sup> qui avaient moins d'effets secondaires. L'association de la triméthoprimé-sulfaméthoxazole a également prouvé son efficacité. Ces antibiotiques sont administrés pendant la période d'incubation et le début de la phase catarrhale, lorsque la bactérie est encore présente dans le tractus respiratoire. Le traitement a donc un effet diminuant la charge bactérienne du système respiratoire supérieur ce qui limite ainsi la transmission et réduit la durée des symptômes. Par ailleurs, l'antibiothérapie préventive peut être utilisée par l'entourage d'un individu infecté pour prévenir d'une éventuelle transmission et pour protéger les personnes les plus vulnérables.

L'apparition de souches circulantes résistantes aux macrolides aux Etats-Unis<sup>56,57</sup>, en Iran<sup>58</sup> et en France<sup>59</sup> est sporadique mais est plus récurrente en Chine<sup>60-62</sup>. Un meilleur dépistage, une meilleure prévention ou l'utilisation de nouvelles familles d'antibiotiques (par exemple des fluoroquinolones) devraient être envisagés pour éviter la propagation de souches résistantes aux macrolides.

## II. Pathogénie de la coqueluche

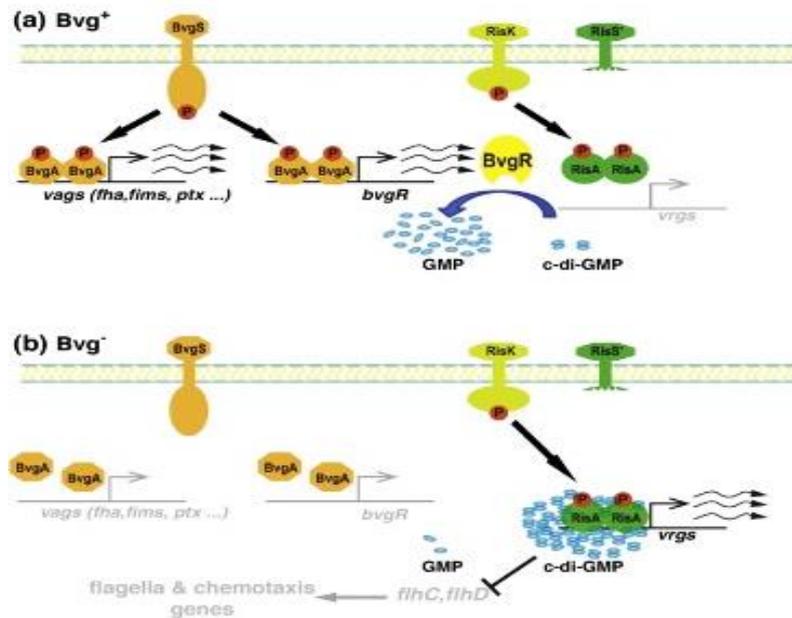
### A. Facteurs de virulence et régulation

*B. pertussis* produit diverses adhésines et toxines (**Fig.5**) en réponse à son environnement direct et nécessite donc une flexibilité d'expression de ces facteurs de virulence pour optimiser son adhérence, l'établissement d'un foyer infectieux et sa persistance sur la muqueuse respiratoire de l'hôte. Premièrement, les facteurs de virulence impliqués dans l'adhérence aux cellules, dont l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), les fimbriae (FIM) et la pertactine (PRN) vont permettre à la bactérie de se fixer à l'épithélium et soit de persister sur la muqueuse, soit d'être internalisée. Ensuite, les facteurs de virulence avec une activité toxique comme le lipooligosaccharide (LOS), la toxine cytotrachéale (TCT), la toxine pertussique (PT) et la toxine adénylate cyclase (ACT) vont endommager mécaniquement les cellules ciliées pour établir un environnement propice à l'établissement du foyer infectieux. Les toxines vont exercer des effets modulateurs de la réponse immunitaire favorable à la réplication de la bactérie. La persistance de la colonisation par *B. pertussis* dans le tractus respiratoire nécessite des mécanismes de résistance contre le système immunitaire de l'hôte<sup>63</sup> conférés par des protéines de surface et des toxines (**Fig.10**). Le développement de la maladie est ensuite attribué aux toxines circulantes.

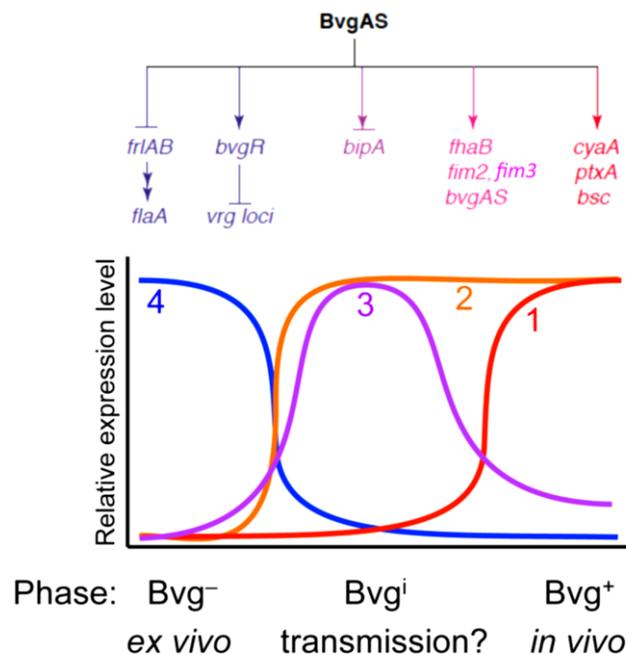


**Figure 5:** Les facteurs de virulence de *B. pertussis* et leur régulation. Les adhésines sont représentées en bleu, les toxines en rouge, les transporteurs en gris et le système à 2 composants en beige. Source : Locht et al., 2001.

## 1. Régulation de la virulence



**Figure 6:** Régulation des gènes de *B. pertussis* sous le contrôle du régulon BvgASR et RisASK, sous des conditions basales, mode Bvg<sup>+</sup> en figure (a), et sous conditions inhibitrices, mode Bvg<sup>-</sup> en figure (b). Source : Chen et al., 2019



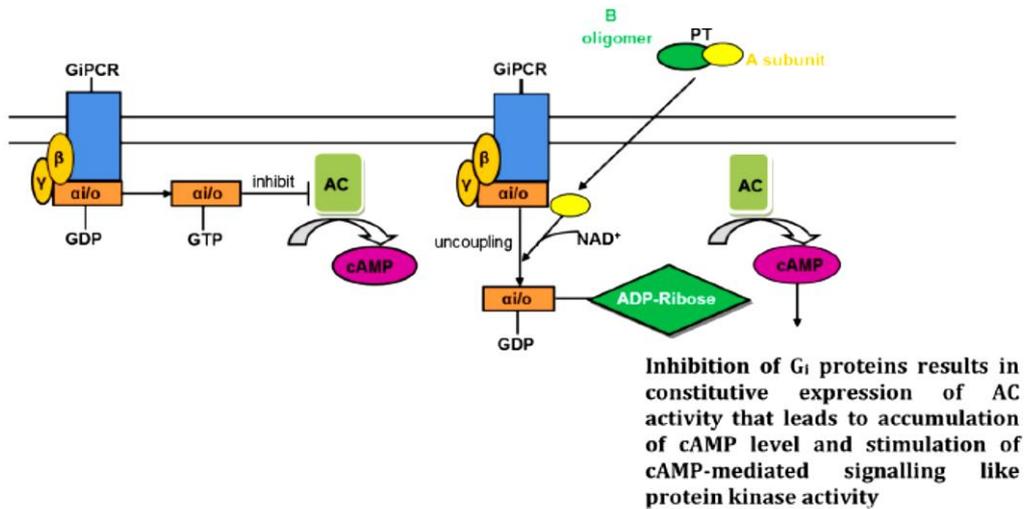
**Figure 7:** Schéma de l'activité du régulon BvgAS. BvgA est un activateur qui va moduler l'expression des gènes cibles en réponse à la stimulation de BvgS, un senseur kinase. A 37°C et *in vivo*, BvgA est phosphorylé, active l'expression des *vags* (ligne rouge) et réprime l'expression des *vrgs* (ligne bleue); c'est la phase Bvg<sup>+</sup>. Cette phase est caractérisée par l'expression maximale des gènes codant les adhésines (*fhaB*, *fim2*, *fim3*) et les toxines (*cya*, *ptx*). A 25°C, en présence de modulateurs chimiques ou en milieu carencé, BvgA n'est pas phosphorylé, active les *vrgs* et réprime les *vags*; c'est la phase Bvg<sup>-</sup>. La phase Bvg<sup>i</sup> apparaît avant l'activation complète de la phase Bvg<sup>+</sup> et jouerait un rôle dans la transmission du pathogène grâce à l'expression du gène *bipA*. Source : Melvin et al., 2014.

*B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* partagent un système semblable de contrôle des gènes de virulence géré par les régulateurs *bvgASR*<sup>64</sup> et *risAKS*<sup>65</sup>. De ces régulateurs dépend l'expression de deux systèmes à deux composants, BvgAS et RisAS, et d'une phosphodiesterase, BvgR. Les systèmes à deux composants sont présents chez de nombreuses bactéries et jouent un rôle essentiel dans l'interaction des bactéries avec leur environnement pour moduler la mobilité, la croissance ou la virulence.

BvgS et RisKS sont des senseur-kinases transmembranaires qui perçoivent les changements environnementaux et phosphorylent respectivement BvgA et RisA, qui sont des activateurs, régulateurs de l'expression des gènes cibles. Chez *B. pertussis*, *risS* est un pseudogène codant une kinase tronquée. La kinase RisK, codée par un gène non-opéronique de *risAS*, prend le relais pour la transmission du signal à RisA. Chez *B. bronchiseptica*, RisS est toujours fonctionnelle et est nécessaire pour la survie dans l'environnement et dans l'hôte<sup>66</sup>. Les signaux environnementaux naturels des *Bordetellae* ne sont toujours pas connus à ce jour, mais une baisse de la température, la présence de sulfate de magnésium ou d'acide nicotinique<sup>67,68</sup> sont utilisés *in vitro* pour moduler la virulence de *B. pertussis*. L'état basal du régulateur est un mode activé, Bvg<sup>+</sup>, correspondant à la phase de virulence (**Fig.6-7**). BvgS subit des modifications moléculaires qui résultent en la phosphorylation de BvgA. La forme BvgA phosphorylée se lie alors aux promoteurs des gènes de virulence appelés *vags* pour « virulence-activated genes ». Ces gènes sont classés en 3 groupes suivant leur expression temporelle *in vivo* : les gènes précoces, intermédiaires et tardifs. Les gènes précoces codent la FHA, FIM et BvgASR, les gènes intermédiaires la PRN et les gènes tardifs la PT et ACT. BvgR exprime une activité c-di-GMP phosphodiesterase qui permet de moduler la quantité intracellulaire de GMP. La fixation de modulateurs aux senseur-kinases empêche la cascade de phosphorylation vers les activateurs inhibant ainsi les gènes de virulence, c'est le mode Bvg<sup>-</sup> qui correspond à la phase d'avirulence.

En phase d'avirulence, ni BvgS, ni BvgA ne sont phosphorylés, entraînant la perte de l'activation des gènes *vags* dont *bvgR*. Le taux intracellulaire de c-di-GMP augmente, induisant la fixation de RisA phosphorylé sur les promoteurs de gènes *vrgs*, pour « virulence-repressed genes » (**Fig.6-7**). Ces gènes sont responsables, entre autres, de l'expression d'une capsule polysaccharidique et de la biosynthèse de flagelles. Contrairement à *B. bronchiseptica* qui utilise le mode Bvg<sup>-</sup> pour survivre à son environnement dans des conditions restrictives en nutriments, chez *B. pertussis*, le rôle exact des *vrgs* reste peu renseigné. Un troisième mode<sup>69</sup>, Bvg<sup>i</sup>, est un mode intermédiaire caractérisé par une expression des *vags* précoces et une absence d'expression des *vrgs* (**Fig.7**). Ils se traduit par une meilleure résistance aux conditions restrictives que le mode Bvg<sup>+</sup> mais par une diminution de la colonisation dans le tractus respiratoire<sup>70</sup>.

## 2. Facteurs de virulence : les toxines



**Figure 8:** Mécanisme d'action de la toxine pertussique sur les protéines G membranaires. L'oligomère B de la PT va permettre la fixation de la toxine sur les cellules cibles alors que l'oligomère A porte l'activité enzymatique. La PT va découpler la sous-unité  $\alpha$  des protéines G $\alpha/\beta/\gamma$  qui est lié au GDP intracellulaire à l'aide d'un cofacteur NAD<sup>+</sup> en libérant un médiateur (ADP-ribose-  $\alpha/\beta/\gamma$ -GDP). Celui-ci va être utilisé par une adénylate cyclase intracellulaire pour former un messager secondaire, AMPc, qui va exercer différents effets pléiotropiques dans la cellule cible d'une part et inhiber les récepteurs couplés aux protéines G<sub>i</sub> (GiPCR) d'autre part. Source : Dorji et al., 2018.

La toxine pertussique ou PT, est également appelée facteur promoteur de lymphocytose. C'est une ADP-ribosyltransférase produite uniquement chez *B. pertussis* et composée d'un oligomère A, qui concentre l'activité enzymatique, et d'un pentamère B, composé du domaine de fixation aux récepteurs cellulaires. La PT n'a pas de récepteur spécifique connu mais se lie à des motifs glycoconjugués à la surface de diverses cellules eucaryotes. Cet hexamère de 117 kDa se compose de la sous-unité S1 pour l'oligomère A et des dimères des sous-unités S2-S4 et S3-S4 reliés par la sous-unité S5 pour former le pentamère B. Après internalisation de PT par endocytose, la sous-unité S1 exerce son activité enzymatique sur les protéines G trimériques en modifiant la sous-unité  $\alpha$ , empêchant la régulation des activités adénylates cyclases des cellules de l'hôte. En conséquence, le taux intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), messager des voies de signalisation intracellulaire, augmente et exerce divers effets pro- et anti-inflammatoire (**Fig.8**). La PT est reconnu par les TLR4, présents à la surface des macrophages et DC, et TLR2<sup>71</sup> et induit l'activation des cellules dendritiques pour une polarisation Th1/Th17 de la réponse lymphocytaire effectrice. La PT induit également une lymphocytose et engendre de nombreux effets pléiotropiques dont une sensibilité accrue à l'histamine, une augmentation de la sécrétion d'insuline et une augmentation de l'activité mitogénique<sup>72</sup>. Les souches déficientes en PT présentent un défaut de colonisation du tractus respiratoire lié à un influx temporaire de neutrophiles<sup>73</sup>. La PT réduit donc le recrutement des neutrophiles par interférence direct avec les récepteurs de chimiokines présent à leur surface et inhibe aussi le

chimiotactisme des LT, LB et monocytes sur le lieu de l'infection<sup>74</sup>. Elle a également des effets sur le système immunitaire adaptatif de par la différenciation des lymphocytes T CD4+ en type Th2 ce qui stimule de la production IgE<sup>75</sup>. Le rôle de PT dans la toux est ambigu, mais contribuerait à la prolonger dans la mesure où les individus convalescents présentant de la toxine circulante sont encore susceptibles aux quintes de toux. Néanmoins, des études préliminaires suggèrent que l'infection de babouins avec une souche déficiente en PT n'induit pas les symptômes caractéristiques de la coqueluche, dont la toux. Enfin, la PT est un des composants des vaccins acellulaires, présent sous forme détoxifié.

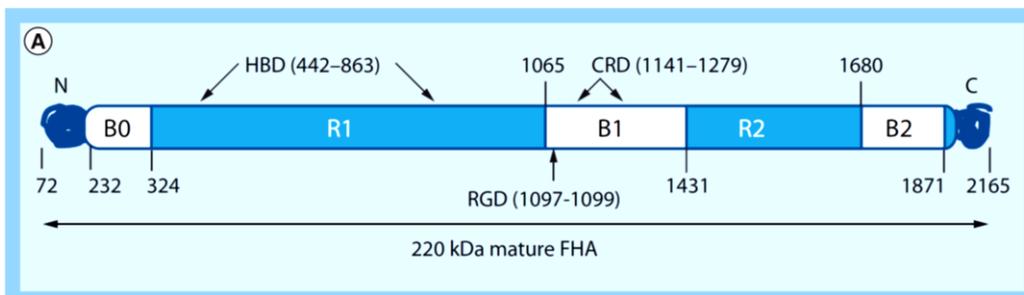
L'adénylate cyclase ou ACT, est une enzyme extra-cytoplasmique de 200 kDa qui exprime une activité cyclase et une activité hémolysine. Cette toxine est capable de se lier aux cellules myéloïdes phagocytaires, notamment les DC, macrophages et neutrophiles, via leur récepteur membranaire au complément (CR3) et de former des pores à travers leurs membranes pour injecter le domaine catalytique. Après liaison à la calmoduline, l'activité intracellulaire d'ACT résulte en une augmentation d'AMPc, messenger secondaire qui altère la réponse immunitaire<sup>76</sup>. L'augmentation du taux d'AMPc bloque la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS)<sup>77</sup> par les monocytes et macrophages, bloque la formation des pièges extracellulaires des neutrophiles (NET) et diminue l'opsonophagocytose médiée par les macrophages<sup>78</sup>. De plus, l'ACT exercerait des effets anti-inflammatoires par l'expansion de cellules T de type Th2, Th17 et Treg<sup>79</sup>. Les mutants de délétion ACT présentent un défaut de persistance dans le tractus respiratoire, avec une pathologie moins sévère que les mutants de délétion PT mais d'autant plus marqué chez le double mutant. Le phénotype ne présente pas de défaut d'influx de neutrophiles<sup>80</sup> mais induit *in vitro* l'apoptose des macrophages et inhibe l'activité phagocytaire des monocytes et neutrophiles<sup>81,82</sup>. Cette toxine compromet à la fois l'intégrité de la barrière épithéliales bronchiques humaine en provoquant une rupture des jonctions serrées et crée un environnement anti-inflammatoire en inhibant la production de  $\beta$ -défensine 2 et TNF $\alpha$ <sup>83</sup>. Ceci, permettant à la bactérie de persister dans le tractus respiratoire. En outre, l'ACT serait associée à la FHA, ce qui la retient à la surface du pathogène pour possiblement être délivrée plus facilement aux cellules de l'hôte<sup>84</sup>.

La toxine dermonécrotique ou DNT, est une protéine cytoplasmique qui induit localement des dommages tissulaires et cellulaires et est létale par voie systémique dans un modèle d'étude murin<sup>85</sup>. C'est une toxine d'environ 160 kDa, sensible à la chaleur et de type A-B, comme la PT. Le récepteur n'est pas encore connu et la contribution de la DNT dans la pathogenèse de *B. pertussis* est incomprise.

La toxine cytotrachéale ou TCT, est un disaccharide-tetrapeptide de 921 Da, dérivé du peptidoglycane. Chez les bactéries à Gram-, les fragments de peptidoglycane sont triés et recyclés par une protéine de membrane, AmpG. Par contre, chez *B. pertussis*, cette protéine membranaire de recyclage n'est pas fonctionnelle, la TCT est donc pas recyclée. Dans un modèle *in vitro*

d'intoxication de cellules épithéliales trachéales de hamster, la TCT inhibe la synthèse d'ADN de ces cellules et cause des disjonctions cellulaires de l'épithélium ainsi que des dommages membranaires. La TCT causerait également la perte des cils sur les cellules ciliées nasales humaines. Les effets cytotoxiques sur les cellules épithéliales ciliées<sup>86</sup> seraient liés à la production d'oxide nitrique par les cellules de l'épithélium respiratoire. Elle joue également un rôle dans le défaut de recrutement *in vitro* de neutrophiles<sup>87</sup>.

### 3. Facteurs de virulence : les adhésines



**Figure 9:** Représentation schématique des domaines structuraux et fonctionnels de la FHA. Forme de la FHA mature avec la représentation des domaines HBD, RGD et CRD. Les régions R1 et R2, en bleues, présentent des séquences répétées propres à chacune et les régions B0, B1 et B2, en blanc, présentent des copies de motifs similaires moins conservés que les régions R. Source : Romero et al., 2014

L'hémagglutinine filamenteuse ou FHA, est une protéine de 367 kDa, codée par *fhaB*, et contrôlée fortement par BvgAS. Elle se présente transitoirement à la surface de la bactérie puis est relarguée dans son environnement. La translocation du précurseur de la FHA (FhaB) se fait au travers du pore formé par la protéine partenaire de sa sécrétion, FhaC. La portion extracellulaire de FhaB est ensuite modifiée par un clivage protéolytique par l'autotransporteur SphB1<sup>88</sup> ancré à la membrane externe, libérant ainsi la forme mature dans le milieu extracellulaire<sup>89</sup>. Cette adhésine possède de nombreux domaines de reconnaissance qui se lient aux récepteurs de surface des cellules épithéliales et lymphocytaires, notamment les sites RGD (arginine-glycine-aspartate motif), CRD (domaine de reconnaissance aux carbohydrates) et HBD (domaine de liaison à l'héparine) qui lui permettent d'exercer de nombreux effets immunomodulateurs<sup>90</sup> (**Fig.9**). La FHA permet donc l'attachement de la bactérie à l'épithélium respiratoire et promeut l'invasion et la colonisation du pathogène dans le tractus nasopharyngé. En effet, les mutants ne produisant pas la FHA présentent un défaut d'adhérence aux cellules ciliées du tractus respiratoire supérieur mais aucun défaut de colonisation au niveau pulmonaire<sup>91,92</sup>. Les domaines HBD permettent une fixation de la FHA aux cellules

épithéliales non-ciliées et est responsable de l'hémagglutination<sup>93</sup>. D'ailleurs, la FHA est nécessaire à la formation et au maintien du biofilm bactérien dans le nez et dans la trachée des souris<sup>94</sup>. Le domaine RGD de la FHA avec la participation de l'intégrine (VLA-5) des cellules épithéliales bronchiques, est impliqué dans la fixation et l'internalisation de la bactérie<sup>95</sup>. Cette fixation induit une surexpression d'immunoglobuline (ICAM-1)<sup>96</sup> sur ces cellules épithéliales, qui est dépendante de VLA-5, et induit des signaux pro-inflammatoires. De plus, le domaine RGD permet la fixation de *B. pertussis* aux monocytes, macrophages et lymphocytes via leur récepteur au complément (CR3)<sup>97</sup>. La capacité d'adhérence de la FHA sur les cellules de l'hôte dépend de la présence de cholestérol dans les radeaux lipidiques<sup>98</sup> et de son association avec l'ACT<sup>99</sup>. La FHA présente donc des propriétés d'agglutination des bactéries et facilitent l'adhérence et la dispersion bactérienne pour une meilleure colonisation et propagation du tractus respiratoire. La FHA possède également des propriétés cytotoxiques, notamment pro-inflammatoire et pro-apoptotique, sur les cellules épithéliales et phagocytaires<sup>100</sup>. Les anticorps produits contre la FHA inhibent la phagocytose par les neutrophiles<sup>101</sup> et altère l'interaction bactérienne dans la formation de biofilm<sup>94</sup>. La FHA est également un des composants des vaccins acellulaires.

Les protéines fimbriales ou Fim sont de sérotype 2 ou de sérotype 3, autrefois appelés pili ou agglutinogènes. Ces structures sont constituées d'un corps de sous-unités majeurs Fim2 ou Fim3, d'une extrémité composée de FimD et sont transloquées par des protéines chaperonnes FimB et FimC. Elles ont un rôle critique dans l'adhérence de la bactérie à l'épithélium muqueux grâce à la présence de domaines HBD<sup>102</sup> et à la surface des monocytes par le VLA-5 via FimD<sup>103,104</sup>. En conséquence, le CR3 des cellules eucaryotes est activé ce qui accroît la fixation de la FHA aux cellules cibles. Les Fim ne semblent pas être impliquées dans la colonisation pulmonaire mais plutôt dans la persistance nasopharyngienne et trachéale<sup>91,92</sup>. Ces protéines exercent un effet anti-inflammatoire d'une part et inhibent la phagocytose des macrophages pulmonaires d'autre part. Comme la FHA, les Fim joueraient un rôle, mineur, dans la formation des biofilms. Les anticorps produits contre les Fim contribuent à la protection<sup>105</sup>. Ceux sont également des composants de certains vaccins acellulaires.

La pertactine ou PRN, est une protéine de la membrane externe de 69 kDa de la famille des autotransporteurs. La PRN mature est produite à partir d'un précurseur et sécrétée par la machinerie Sec. La protéine est constituée d'un motif RGD et de sites riches en proline impliqués dans l'adhérence et l'invasion cellulaire. Dans un modèle *in vivo* d'infection par un mutant n'exprimant pas la PRN, il n'a pas été observé de défaut de colonisation ni dans la trachée ni dans le poumon, suggérant un rôle secondaire de la PRN pour l'adhérence des bactéries<sup>106,107</sup>. La PRN induit également une résistance à la clairance par les neutrophiles<sup>108</sup>. Les anticorps induits contre la PRN causent l'agglutination de la bactérie, protègent contre l'infection

dans le modèle souris et favorisent la phagocytose. C'est également un des composants des vaccins acellulaires trivalents.

Le facteur de colonisation trachéale ou TcfA, présent uniquement chez *B. pertussis*, est un autotransporteur de 34 kDa qui joue un rôle majeur dans la colonisation de la trachée mais pas dans la colonisation pulmonaire<sup>109</sup>. Les mécanismes d'action et le rôle de TcfA dans la pathogénie de *B. pertussis* ne sont pas à ce jour élucidés.

#### 4. Autres facteurs

Le lipooligosaccharide ou LOS, codé par 2 loci : *wlb* et *wbm*, est présent uniquement chez *B. pertussis*. C'est une endotoxine composée d'un lipide A, d'un core polysaccharidique mais ne possède pas de répétition de l'antigène O. Le LOS est requis pour une colonisation efficace<sup>110</sup> du tractus respiratoire et protège *B. pertussis* de l'action du surfactant<sup>111</sup>. Le LOS de *B. pertussis* est tout de même reconnu par les TLR4 et sa fixation induit différentes cascades de signalisation intracellulaire. D'une part, il induit la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ) et d'autre part favorise l'expansion d'une population lymphocytaire de type Tr1 et la production de cytokines anti-inflammatoires (IL10)<sup>112</sup>. Ceci implique que le LOS module la réponse immunitaire afin de limiter l'inflammation locale et les dommages tissulaires. Il serait responsable des réactions inflammatoires (pyrogène, mitogène, cytotoxique) dans les vaccins à germe entier inactivés<sup>111</sup>, néanmoins il a montré que les anticorps induits contre le LOS sont protecteurs car favorisent la clairance du pathogène en agglutinant les bactéries.

Le facteur de résistance à la lyse par complément ou BrkA est une protéine de la famille des autotransporteurs de 32 kDa. Elle est associée à la membrane externe et aurait un rôle dans la colonisation précoce du micro-organisme et confère une certaine résistance à la voie classique du complément de l'hôte<sup>113</sup>. En effet, les mutants de délétion BrkA sont létaux dans un modèle de jeunes souris<sup>114</sup> et présentent un défaut de colonisation trachéal et pulmonaire<sup>115</sup>. Les anticorps induits contre BrkA sont bactéricides et protecteurs contre la colonisation<sup>45,116</sup>.

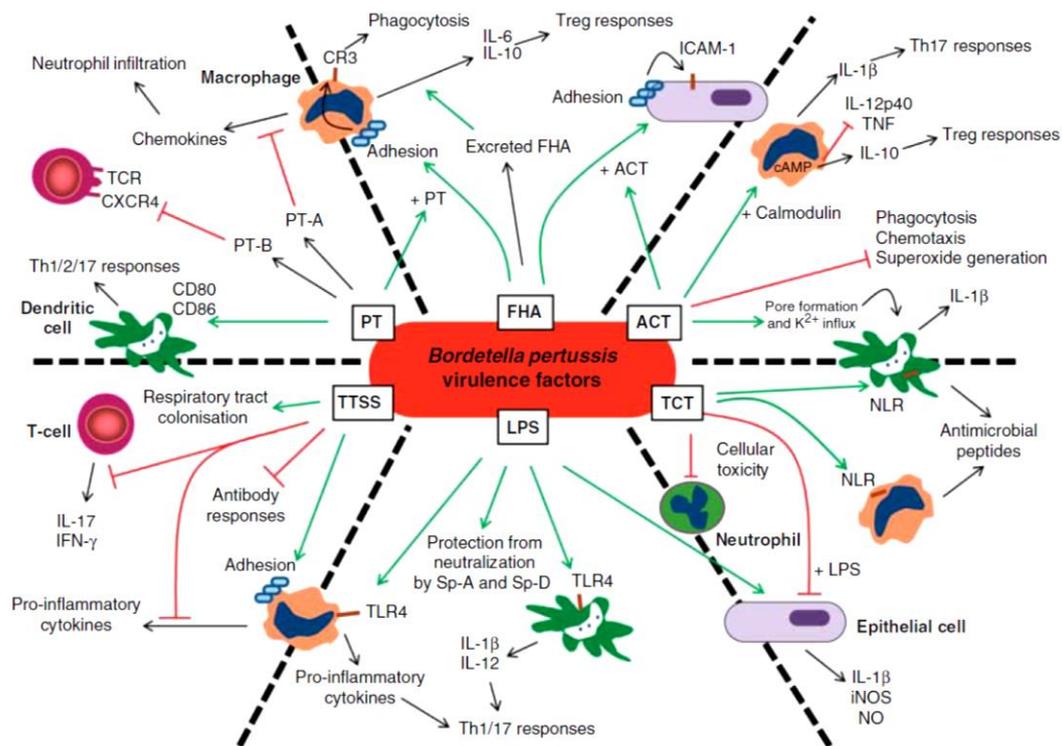
La protéine associée à la virulence Vag8, est un autotransporteur de 95 kDa, et confère une résistance à la lyse par le complément en ciblant la voie classique et celle des lectines<sup>117,118</sup>.

Le système de sécrétion de type III ou TTSS, est un ensemble de protéines qui permet l'injection de molécules effectrices, dont des facteurs de virulence, directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. La mutation de *bscN*, un gène

indispensable pour la sécrétion des effecteurs via le TTSS, a montré un défaut de colonisation de la bactérie associé avec une aggravation de la réponse pro-inflammatoire locale<sup>119</sup>.

Le biofilm est une formation structurée qui permet à de nombreux pathogènes des muqueuses d'établir une colonisation au sein de structures ciliées et d'y persister malgré les défenses immunitaires locales. *B. pertussis* est capable d'établir des biofilms<sup>120</sup> dans des conditions Bvg<sup>+</sup>. Le locus *bpsABCD* a été identifié comme produisant des polysaccharides nécessaires à la formation des biofilms chez *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* et *B. pertussis* et à la colonisation dans le nez et la trachée à des stades précoces de l'infection<sup>121,122</sup>. Les mécanismes moléculaires sous-jacents de formation sont encore mal connus à ce jour.

## 5. Résumé



**Figure 10:** Schéma récapitulatif des effets immunomodulateurs de *B. pertussis* sur le système immunitaire de l'hôte. Source : Higgs et al., 2012.

## B. Réponse immunitaire

Le système respiratoire est exposé à chaque instant à des micro-organismes, qu'ils soient pathogènes ou non, et à des particules sensibilisantes qui peuvent altérer l'intégrité de la muqueuse. Le tissu épithélial mucosal est donc la première barrière physique qui empêche une éventuelle invasion microbienne pathogène. La sécrétion de mucus, de surfactant et d'agents antimicrobiens d'une part et la présence des cellules immunitaires sentinelles dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse (MALT)<sup>123,124</sup> dont la muqueuse nasale (NALT) et bronchique (BALT) d'autre part, sont le siège de la réponse immunitaire locale pour contrôler l'infection et l'inflammation<sup>125</sup>. Dans le cadre d'une infection à *B. pertussis*, la réponse cellulaire et la réponse humorale dialoguent conjointement pour une réponse immunitaire efficace (**Fig.11**).

La durée de l'immunité induite par l'infection naturelle serait estimée de 7 à 20 ans voire jusque 30 ans, alors que celle induite suite à la vaccination aP et wP serait équivalente et comprise entre 4 à 12 ans<sup>126,127</sup>.

### 1. Modulation de la réponse immunitaire après infection

Une infection à *B. pertussis* chez la souris induit une infiltration précoce de cellules dendritiques (DC) et macrophages, puis de neutrophiles et cellules natural killer (NK), et enfin de lymphocytes dans les poumons<sup>125</sup>. Des anticorps spécifiques IgG, transsudant du sérum, et IgA, sécrétés dans la lumière du tractus respiratoire, sont également des acteurs importants de la réponse immunitaire.

#### a. Réponse cellulaire

Les DC ont un rôle primordial dans la présentation de l'antigène aux autres acteurs de la réponse cellulaire et dans la sécrétion de cytokines et chimiokines favorables au recrutement et à l'infiltration cellulaire. La reconnaissance du pathogène s'effectue via des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) présents à la surface de la bactérie, par des récepteurs de reconnaissance de ces motifs moléculaires (PRRs) sur les cellules présentatrices d'antigènes (APC). Le LOS de *B. pertussis* se fixant au TLR4 permet la maturation des DC et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires pour promouvoir un environnement cellulaire de type Th1. D'autre part, la reconnaissance de l'ACT par les récepteurs Nod (NLR) promeut un environnement plutôt Th17<sup>128</sup>, qui avec la voie Th1, stimule la clairance

du pathogène. Toutefois, il a été montré que la FHA stimule la production de cytokines régulatrices (IL-10) par les DC, et que ces dernières dirigent la différenciation des LT en type Tr1<sup>129</sup>. Cette voie Tr1 représente un des nombreux mécanismes d'évasion de *B. pertussis* à la réponse du système immunitaire.

Les macrophages alvéolaires présents au site d'infection, sont nécessaires à la clairance du pathogène<sup>130</sup> mais sont également potentiellement une niche pour la survie intracellulaire de *B. pertussis*. Le domaine RGD de la FHA permet la fixation au CR3 des macrophages puis l'internalisation de la bactérie se fait sans stress oxydant par le NO. En effet, la plupart des bactéries sont immédiatement lysées après la phagocytose, mais une partie est capable d'y survivre et même de s'y multiplier<sup>131</sup>. La lyse bactérienne s'effectue par la production de NO, induit par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires<sup>132</sup> (IFN- $\gamma$ ) et par la production d'IL17<sup>133</sup>.

L'infiltration précoce des neutrophiles se fait dans un environnement pro-inflammatoire suite à la production d'IL17 par les cellules T  $\gamma\delta$  et de chémokines de type CXCL2 par les macrophages activés et les cellules épithéliales. Le recrutement perdure par la suite via la sécrétion de cytokines de type Th1/Th17 par les lymphocytes T. Néanmoins, la PT a été montrée comme pouvant retarder l'infiltration pulmonaire des neutrophiles et conjointement l'ACT inhibe leurs capacités phagocytaires<sup>134</sup>. *B. pertussis* est capable de survivre transitoirement dans les neutrophiles<sup>98</sup>.

Les cellules NK produisent de l'IFN- $\gamma$ , améliorent l'activité lytique des macrophages et induisent la voie Th1 afin de contenir l'infection bactérienne. En effet, la déplétion des cellules NK résulte en une dissémination létale du pathogène dans le foie des souris infectées<sup>135</sup>.

L'infection par *B. pertussis* induit un profil cellulaire pro-inflammatoire orienté Th1/Th17. En effet, les lymphocytes T présents chez des enfants infectés ou convalescents sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2, et peu d'IL-4 et IL-5<sup>136</sup>, correspondant respectivement à la voie Th1 et Th2. Le récepteur à l'IFN- $\gamma$  est nécessaire pour le contrôle de l'infection et son confinement à la muqueuse des poumons dans le modèle souris<sup>137</sup>. La non-fonctionnalité du récepteur provoque une dissémination létale de la bactérie dans le sang, le foie et les reins, alors que dans un modèle IFN- $\gamma$   $\gamma^{-/-}$ , la colonisation pulmonaire n'est pas différente du modèle sauvage. Par ailleurs, la colonisation pulmonaire est persistante pendant plus de 100 jours post-infection chez des souris qui présentent une mutation sur la chaîne  $\mu$  des immunoglobulines, suggérant que la réponse anticorps est nécessaire à la clairance complète du pathogène.

Un autre type de lymphocytes recrutés par *B. pertussis* sont les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui ont la propriété d'inhiber la prolifération des populations de lymphocytes effecteurs (Th1, Th17) dans le but de créer un environnement de tolérance immunitaire. La FHA et l'ACT induisent la production locale d'IL-10 qui

inhibe la production et la maturation des cellules phagocytaires en faveur du recrutement des Treg<sup>79,129</sup>. Cette population de cellules et notamment les Tr1, produit en quantité l'IL-10 qui a un effet suppresseur de la voie Th1. *B. pertussis* établit donc un environnement immunosuppresseur afin de persister plus longtemps chez son hôte.

## **b. Réponse humorale**

Outre la réponse cellulaire, des effecteurs solubles de la réponse immunitaire innée sont également impliqués dans le contrôle de l'infection, comme les peptides antimicrobiens (AMP) et les protéines du complément mais aussi du système immunitaire adaptatif, comme les anticorps.

La littérature n'est pas abondante sur l'importance des AMP pour le contrôle précoce de l'infection à *B. pertussis*<sup>138</sup>, néanmoins il a été montré que les  $\beta$ -défensines jouent un rôle protecteur dans l'infection pulmonaire chez le porcelet<sup>139</sup>.

Le rôle du complément et des anticorps dans le cadre d'une infection a été détaillé dans une revue<sup>140</sup> publiée au cours de la thèse en **annexe 1**.

Des premières expériences de transfert de sérum hyperimmun issu d'individus convalescents sur des enfants exposés à la coqueluche ont montré que les immunoglobulines présentes dans le sérum exerçaient un rôle protecteur contre la maladie<sup>141</sup>. De même, une mutation sur la chaîne  $\mu$  des immunoglobulines, altérant la production d'immunoglobulines, provoque une infection chronique chez la souris<sup>137</sup>. La réponse anticorps sérique générée suite à une infection à *B. pertussis* chez la souris reflète une expansion majoritaire de l'isotype IgG2a avec ou sans IgG1 chez les souris BALB/c ou C57BL/6, respectivement<sup>142</sup>, indicateur d'une réponse cellulaire de type Th1. Chez l'Homme, seul l'isotype IgG1 est produit en quantité suite à une infection<sup>143</sup> ainsi que des IgA<sup>144</sup> sériques. Ces IgA sériques inhibent l'adhérence aux cellules épithéliales trachéales humaines<sup>145</sup> et améliorent la clairance du pathogène par opsonophagocytose via les récepteurs aux IgA (CD89) des polymorphonucléaires<sup>146</sup>. Néanmoins, dans un modèle souris déficient en production d'IgA, il semble que cet isotype ne participe pas à la clairance du pathogène dans le nez, la trachée ou les poumons<sup>147</sup>. Toutefois, l'utilisation du vaccin candidat BPZE1 en modèle souris a montré l'importance des IgA sécrétoires présents dans les sécrétions nasales pour la clairance mucoale du pathogène dans le tractus supérieur<sup>148</sup> - dans le cadre la thèse, j'ai également participé à ce travail de recherche dont la publication est disponible en **annexe 2**.

## 2. Modulation de la réponse immunitaire après vaccination

### a. Réponse cellulaire

Une vaccination avec des vaccins wP induit majoritairement une sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez la souris<sup>149</sup> et le babouin<sup>25,150</sup>, indiquant un profil Th1/Th17. Alors que chez l'Homme<sup>151</sup>, la production d'IFN- $\gamma$ , profil Th1, est induite suite à une vaccination wP, le rôle des lymphocytes de type Th17 n'a pas encore été investigué. La réponse cellulaire induite suite à une vaccination wP est donc proche de celle induite lors d'une infection naturelle. Or, après une première vaccination avec des vaccins aP, des études chez l'Homme ont montré que le profil cellulaire induit était majoritairement de type Th2<sup>151,152</sup> (IL13, IL5) avec toutefois une réponse Th1 (IFN- $\gamma$ ). Ce profil Th1/Th2 est également observé dans le modèle babouin<sup>25</sup>. Dans le modèle souris, la production majoritaire d'IL-4 et d'IL-13 suite à une vaccination aP reflète une différenciation cellulaire de type 2. Toutefois, de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-17 sont également sécrétés suite à une vaccination aP. Chez l'Homme, la primo-vaccination aP influence la réponse anticorps contre des antigènes coadministrés avec ceux anticoquelucheux contrairement à la vaccination wP, dont l'induction d'IgE anti-toxine tétanique<sup>153</sup>. Et suite à la 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> dose de rappel avec les vaccins aP, la réponse Th2 est d'autant plus marquée par l'augmentation de sécrétion d'IL-4 et d'IL-5, avec notamment une sécrétion d'IgE dirigé contre la PT<sup>154</sup>, sans risque accru de développer des syndromes allergiques. Par ailleurs, il a été montré qu'après le 5<sup>ème</sup> rappel, la protection induite décline dès 5 ans<sup>43</sup> malgré une bonne activité opsonophagocytaire des neutrophiles et un taux sérique d'anticorps élevé<sup>41</sup>.

Les cellules B activées suite à la rencontre des antigènes, lors d'une immunisation naturelle ou d'une vaccination, évoluent en cellules B mémoire (B<sub>mem</sub>) qui circulent activement dans le sang. Ces cellules sont encore détectables au-delà de 5 ans après la vaccination aP ou wP, alors que le taux d'anticorps sériques a fortement diminué<sup>155,156</sup>.

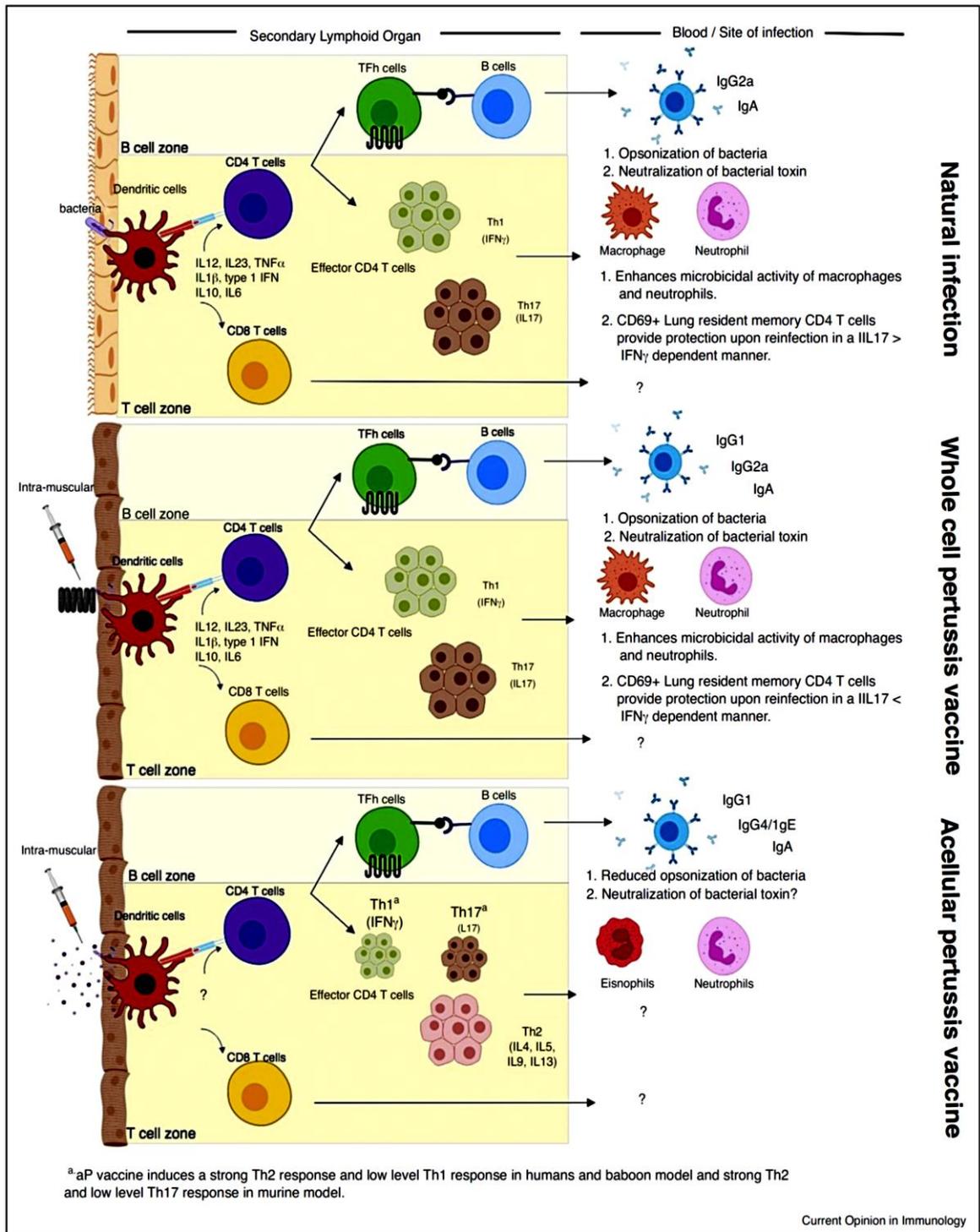
Récemment, une population de lymphocytes T mémoire résidant dans les tissus périphériques, les T<sub>RM</sub>, a été identifiée<sup>157</sup>. Elle jouerait un rôle important pour la protection pulmonaire et nasale. La vaccination wP, comme l'infection naturelle<sup>157</sup>, permet le recrutement des T<sub>RM</sub> produisant de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-17 responsable de la clairance du pathogène, contrairement à la vaccination aP qui n'induit pas ce recrutement<sup>158</sup>.

## b. Réponse humorale

A ce jour, aucun corrélat de protection n'est établi pour *B. pertussis* malgré les efforts de la communauté scientifique dans l'étude de la réponse sérique humorale. Dans ce sens, la caractérisation qualitative et quantitative systématique des sérums a permis d'identifier les antigènes protecteurs afin d'élaborer des vaccins efficaces.

Des expériences d'immunisation active et passive avec des vaccins aP ou wP, chez la souris, ont montré l'importance des anticorps dans la clairance du pathogène dans les poumons<sup>142</sup>. Les vaccins aP génèrent un profil anticorps de type IgG1 et IgG4, reflet de la voie Th2, chez l'Homme alors que les vaccins wP induisent préférentiellement des anticorps de type IgG1 et ni les vaccins aP ni les vaccins wP n'induisent d'IgG2 et IgG3<sup>143</sup>. Chez la souris, les isotypes d'anticorps induits après vaccination diffèrent également en fonction du fond génétique des souris. Les BALB/c induisent autant d'IgG1 que d'IgG2a suite à une vaccination wP et plus d'IgG1 que d'IgG2a suite à une vaccination aP alors les souris C57BL/6 induisent plus d'IgG2a que d'IgG1 après wP et autant des 2 isotypes après aP<sup>142</sup>.

Les individus vaccinés avec un aP monovalent, ne contenant que la PT, développent une réponse anticorps IgG anti-PT protectrice contre la maladie<sup>159</sup>. Néanmoins, les vaccins contenant de la FHA combinée à la PT sont plus efficaces contre les formes sévères de la maladie. De plus, les vaccins à 3 composants (PT, FHA, PRN) semblent être plus efficaces que les vaccins à 2 composants, mais moins que les vaccins à 5 composants (avec Fim2 et Fim3)<sup>27</sup>. Les anticorps anti-PT neutralisant joueraient un rôle dans la protection contre les formes sévères de la maladie chez des enfants exposés aux pathogènes<sup>159</sup>. Les anticorps anti-PRN sont essentiels pour la réponse cellulaire, en particulier pour améliorer l'opsonophagocytose par les lymphocytes polymorphonucléaires<sup>160</sup>. L'intérêt des anticorps anti-Fim<sup>105,161</sup> et anti-FHA<sup>162</sup> est également montré dans la protection contre les formes classiques de coqueluche chez les enfants.



**Figure 11:** Détail de la réponse immunitaire cellulaire et humorale induite suite à une infection naturelle ou une immunisation avec les vaccins wP ou aP. Source : Kapil et al., 2019

## C. Modèles animaux de la coqueluche

*B. pertussis* a longtemps été étudiée dans un modèle d'infection du tractus respiratoire pulmonaire et lors d'épreuves intracérébrales chez la souris, ce qui a permis d'élucider de nombreux mécanismes immunitaires induits lors d'une infection ou suite à une vaccination coquelucheuse. Cependant, comme *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont des pathogènes infectant l'Homme, leur étude en modèle murin nécessite souvent de fortes doses d'inoculation du pathogène pour établir une colonisation dans le tractus respiratoire. Dans cette optique, le modèle murin est un modèle d'étude qui peut être limitant pour une étude plus approfondie des mécanismes immunologiques de l'hôte et pathogéniques de la bactérie. Néanmoins, la disponibilité des souris présentant divers fonds génétiques a permis d'étudier plus précisément le rôle de certaines cellules et molécules effectrices de l'immunité responsables de la protection, mais aussi les mécanismes d'action des facteurs de virulence et d'évasion mis en place par la bactérie.

La mise en place d'un modèle primate non-humain de la coqueluche, chez le babouin, permet d'étudier plus précisément la pathogenèse et les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte, d'une part, et fournit, d'autre part, un modèle d'hôte plus relevant que celui de la souris<sup>163</sup>. En effet, la coqueluche chez le babouin<sup>164</sup> induit les symptômes classiques (toux paroxystique et lymphocytose) de la maladie, la colonisation nasopharyngée et pulmonaire<sup>165</sup>, et est un excellent modèle pour étudier la transmission du microorganisme dans la mesure où les babouins sont capables de tousser, contrairement aux souris. Enfin, le modèle babouin semble être idéal comme outil d'aide au développement de vaccin puisque ces primates présentent les 4 mêmes isotypes d'IgG rencontrés chez l'Homme<sup>166</sup>.

### **III. La réponse immunitaire humorale adaptative: les anticorps**

L'immunité adaptative est un des deux bras de la réponse immunitaire globale, hautement spécialisée dans la réponse aux pathogènes et capable d'induire une mémoire immunitaire durable et efficace contre ces mêmes pathogènes. Les anticorps sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale. Bien que l'immunité à médiation cellulaire semble également jouer un rôle protecteur contre la coqueluche, ce mémoire s'est focalisé sur la réponse anticorps. Nous développerons dès lors par la suite uniquement l'immunité humorale.

#### **A. Découverte des anticorps et de leurs fonctions**

En 1887, Paul Ehrlich<sup>167</sup> élabore une théorie sur la réponse immunitaire acquise « non-héréditaire » selon laquelle des molécules immunisantes « antikörper » peuvent-être transmises de la mère à l'enfant, lors du transfert placentaire et de l'allaitement, mais disparaissent rapidement après quelques semaines, rejetant donc le caractère génétique de l'immunité. Il contribua également, avec l'aide de Behring en 1894, au développement des premiers antisérum diphtériques considérés comme nouvelle approche thérapeutique contre les maladies bactériennes. Il note ainsi que ces molécules immunisantes peuvent se lier à la fois à des microorganismes et à des particules appelées additives, qui sont en fait des protéines du complément, pour éliminer un pathogène. Il suggère de ce fait que les anticorps possèdent 2 sites de fixation, plus tard définis comme la valence de l'anticorps. Ehrlich décrit notamment la formation du complexe anticorps-antigène en 1897 par la théorie « side-chains » selon laquelle la liaison s'opère sur des structures spécifiques avec des interactions de type clé-serrure. Cette théorie fut confirmée dans les années 40 par Pauling, indiquant que l'interaction anticorps-antigène dépend en outre de la composition chimique mais réside essentiellement dans la structure tertiaire du site de fixation. Plus tard, Porter et Edelman ont reçu le prix Nobel de médecine de 1972 pour leurs caractérisations de la structure détaillée des anticorps (ponts disulfures, chaînes lourdes et chaînes légères, fragments et régions).

En 1900, J. Bordet décrit les anticorps comme « substance sensibilisatrice », capable d'agglutiner les globules rouges et de les lyser en présence de complément<sup>168</sup>, « alexine ». La découverte du complément a été attribuée à Hans Büchner 10 ans plus tôt et renommé complément par P. Ehrlich en 1892. J. Bordet soutient alors la théorie de l'immunité humorale de Behring, en parallèle de la

théorie sur l'immunité à médiation cellulaire élaborée par Metchnikoff<sup>169</sup>, selon laquelle l'immunité conférée dans les sérums immuns est également médiée par des molécules solubles, et non pas exclusivement par des cellules présentes dans les fluides biologiques.

D'autres termes, comme les ambocepteurs ou les immunisines ont été utilisés avant l'emploi définitif du terme anticorps par homologie au terme antitoxine définie par Behring et Kitasato en 1890. Les antitoxines sont des composants solubles capables de neutraliser l'activité des toxines et les anticorps des molécules solubles dirigés contre des corps étrangers. En 1895, Pfeiffer parle de bactériolyse comme substance sérique capable d'induire la lyse bactérienne par l'action du complément. A la même époque, Gruber et Kraus définissent respectivement les agglutinines et les précipitines, comme des éléments du sérum pouvant agréger des bactéries ou induire un précipité insoluble de toxine bactérienne. Wright et Douglas investiguent en 1904 l'opsonisation des corps étrangers et parlent d'opsonines, des éléments sériques recouvrant les membranes pour faciliter la phagocytose. Toutes ces substances décrites dans la littérature reflètent donc les différentes fonctions effectrices associées aux anticorps, antitoxique ou neutralisant, bactériolytique ou hémolytique, agglutinant ou hémagglutinant, précipitant et opsonisant.

La production d'anticorps par des plasmocytes<sup>170</sup>, cellules issues de la différenciation de lymphocytes B présents dans les tissus et muqueuses, a été élucidée par Fagreaus au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle. Ensuite, le modèle de sélection clonale de Burnet<sup>171</sup> a été une première amorce sur le concept de l'auto-immunité, la tolérance immunitaire et l'hypermutation somatique. Il y explique que les lymphocytes présentent à leur surface des anticorps spécifiques d'un antigène et se différencient pour produire en quantité ces anticorps après la rencontre de cet antigène. Plus tard, S. Tonegawa<sup>172</sup> reçut un prix Nobel de médecine pour ses recherches sur les réarrangements génétiques responsables de la diversité du répertoire des anticorps.

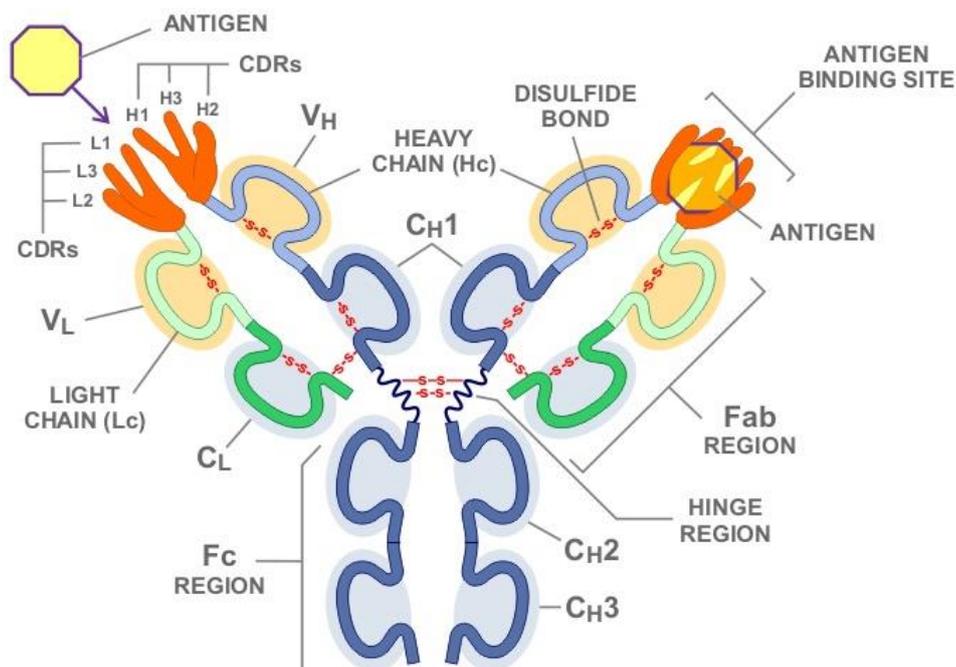
La fin du 20<sup>ème</sup> siècle fut marquée par des découvertes fondamentales comme la distinction des différents types d'anticorps et leurs implications physiologiques, les IgA sécrétoires et leurs rôles dans l'immunité muqueuse ont été découverts par Tomasi<sup>173</sup>, les IgD, dont la fonction est mal connue, par Fahey<sup>174</sup> et les IgE et leurs implications dans les réponses allergiques par Ishizaka<sup>175</sup>. Enfin, l'invention des anticorps monoclonaux<sup>176</sup>, qui a valu à Köhler et Milstein un prix de Nobel de médecine en 1984, a révolutionné la science pour leurs diverses applications en tests diagnostiques, en analyses biochimiques et notamment dans le domaine thérapeutique en traitement anti-cancer ou anti-inflammatoire.

## B. Le répertoire des anticorps

Les microorganismes présentent à leur surface une multitude de protéines, glucides et lipides qui sont autant de cibles potentielles pour activer le système immunitaire et déclencher une réponse anticorps efficace. Des altérations génétiques constantes sur les gènes responsables de l'expression des anticorps permettent également de varier activement le répertoire.

### 1. Structure et propriétés des anticorps

#### a. Structure d'un monomère



**Figure 12:** Modèle structural en forme de « Y » d'un monomère d'anticorps. Il est composé de 2 chaînes lourdes (HC) et 2 chaînes légères (LC) identiques 2 à 2. Une HC contient 1 région variable (VH) et 3 à 4 régions constantes (CH<sub>x</sub>), alors que la LC est constituée de 1 domaine variable (VL) et 1 domaine constant (CL). Les domaines variables présentent des régions hypervariables (CDR) qui forment le paratope, zone de fixation de l'épitope de l'antigène. Les chaînes sont reliées entre-elles par des ponts disulfures. Les bras et le corps du « Y » sont reliés par une région charnière. Un anticorps est caractérisé par son fragment effecteur (Fc) et son fragment permettant la fixation de l'antigène (Fab). Source : <https://teaching.ncl.ac.uk/bms/wiki/index.php/Antibody>

Les anticorps sont des glycoprotéines sériques et mucosales, globulaires, de haut poids moléculaire et de la famille des immunoglobulines (Ig). La superfamille des immunoglobulines comporte des protéines membranaires (récepteurs) et des protéines solubles (anticorps) partageant un même domaine structural spécifique, le domaine Ig<sup>177</sup>. Ce domaine est impliqué dans les interactions protéines-protéines et est présent dans de nombreuses molécules impliquées dans la réponse immunitaire comme des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), des molécules d'adhésion (ICAM, SIGLEC) ou des récepteurs à cytokines (IL1R1/2, IL6R).

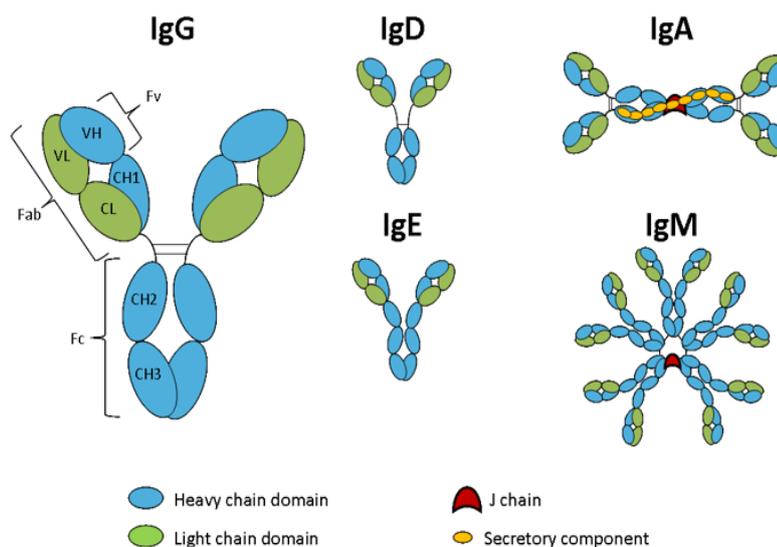
En forme de « Y », un monomère contient 4 chaînes polypeptidiques, 2 chaînes lourdes identiques formant le « Y », notées HC (heavy chain), et 2 chaînes légères identiques formant les bras du « Y », notées LC (light chain) (**Fig.12**). Les bras et le corps du « Y » des IgG, IgA et IgD sont reliés entre-eux par une région charnière. Moduler sa longueur, sa flexibilité et sa conformation jouerait un rôle dans les fonctions effectrices de l'anticorps, mais la littérature dans ce domaine est encore incomplète et discordante. Les HC et LC sont connectées entre-elles par des ponts disulfures inter- et intra-chaînes qui augmentent considérablement la stabilité de la protéine. Ces chaînes sont caractérisées par des régions constantes, notées C<sub>n</sub>, et variables, notées V<sub>n</sub>. La HC est composée d'un domaine variable (VH, variable heavy chain) et de 3 à 4 domaines constants (CH<sub>x</sub>, constant heavy chain) alors que la LC est composée d'un domaine variable (VL, variable light chain) et d'un domaine constant (CL, constant light chain). Le domaine variable est constitué de 3 sous-régions hypervariables qui sont appelées régions déterminants la complémentarité ou CDR (complementarity determining region). Elles sont espacées par des régions plus stables appelées régions charpentes, notées FR (framework region). Ces CDR peuvent physiquement se rapprocher pour former le paratope, zone de fixation de l'épitope. Un monomère d'anticorps possède donc 2 paratopes qui autorisent la fixation de 2 épitopes, sans considérer l'encombrement stérique potentiel. On parle alors de valence d'un anticorps pour le nombre de site de fixation d'antigène. Le paratope est propre à un anticorps de par sa séquence et sa conformation et reflète la spécificité de fixation sur un épitope d'un antigène.

La structure globale d'un anticorps est définie par (1) la structure primaire déterminée par la séquence en acides aminés, (2) la structure secondaire déterminée par la conformation obtenue après interactions entre les différents acides aminés (feuillet β), (3) la structure tertiaire déterminée par le repliement dans l'espace de la protéine (et les ponts disulfures) et (4) la structure quaternaire déterminée par l'agencement spatial des différentes chaînes protéiques entre-elles pour former une protéine multimérique.

La caractérisation des anticorps peut également se faire en fonction des différentes parties structurales et fonctionnelles de ces derniers<sup>178</sup>. Après digestion à la papaïne, protéase à cystéine, l'anticorps se scinde en 1 fragment cristallisable

représentant le corps du « Y », noté Fc, et 2 fragments portant le site de fixation de l'antigène représentant les bras du « Y », noté Fab (fragment antigen-binding site). Le fragment Fc, composé uniquement des CH<sub>x</sub>, porte l'activité effectrice de l'anticorps nécessaire à l'élimination du pathogène et le fragment Fab, constitué de CH<sub>1</sub>, VH, CL et VL, porte le site de reconnaissance et de fixation de l'épitope. La région variable, VH et VL est également appelée fragment variable, noté Fv. La digestion à la pepsine, endoprotéase, permet quant à elle d'isoler les 2 Fab avec la région charnière, noté F(ab')<sub>2</sub>, et un Fc partiellement dégradé, noté pFc'. Des préparations de Fab sont commercialisées et utilisées largement dans le domaine médical comme anti-venin (Crofab), outil diagnostique (Arcitumomab, cancer colorectal) et traitement thérapeutique (abciximab, anti-coagulant ; ranibizumab, anti-angiogénique).

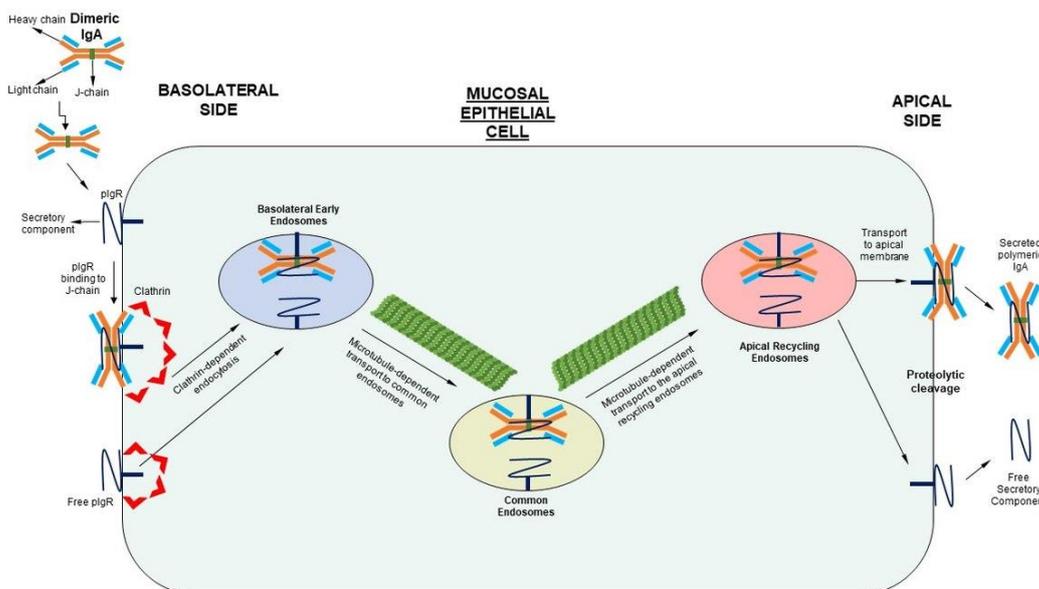
## b. Isotypes, idiotypes et allotypes



**Figure 13:** Représentation de la structure des 5 isotypes d'immunoglobulines. Les IgG, IgD et IgE sériques sont monomériques alors que les IgA sécrétoires sont dimériques et les IgM sériques pentamériques. Les IgG, IgD et IgA peuvent être composées de 3 domaines constants sur la HC et les IgE et IgM de 4 domaines constants sur la HC. Les IgA sécrétoires et IgM sériques possèdent une chaîne J reliant les différents monomères entre eux, et ces IgA sont entourées d'un composant sécrétoire. La structure des régions charnières est différente pour chaque isotype. Source : <https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-isotypes-subtypes/>

L'isotype d'un anticorps est défini par la classe et la sous-classe de ses chaînes (Fig.13). Il existe 5 types de HC qui définissent la classe des anticorps chez les mammifères notés  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  qui correspondent respectivement aux anticorps de classe IgA, IgG, IgM, IgD et IgE et 2 types de LC, notés  $\lambda$  et  $\kappa$ . La chaîne  $\kappa$  représente 60% des LC chez l'Homme contre 95% des LC chez la souris. Les sous-types ne concernent que les IgA, IgA1 et IgA2 et les IgG, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 chez l'Homme. Chez la souris, les sous-types de l'IgG sont appelés autrement, soit IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3.

Les IgG, IgE et IgD sont des monomères d'immunoglobuline alors que les IgA sériques quand ils sont sécrétés, sont sous forme dimériques et les IgM (sIgM) sont sous forme pentamériques. De plus, les IgG, IgA et IgE sont uniquement solubles alors que les IgM monomériques et IgD peuvent être membranaires. Les plasmocytes muqueux sécrètent des pentamères d'IgM et des dimères d'IgA (Fig.14). Ils sont associés à une chaîne J<sup>179</sup>, peptide de 15 kDa, indispensable pour la sécrétion mucale du pôle basal vers apical des cellules épithéliales permettant la fixation au récepteur polymérique d'immunoglobuline (pIgR). Suite à la transcytose, les sIgA et sIgM emportent une partie du pIgR fixé sur la chaîne J, formant le composant sécrétoire de taille 70 kDa, et apporte une protection contre la dégradation par des sucs digestifs ou des enzymes protéolytiques<sup>180</sup>. Ce composant est lié plus fortement sur les sIgA que sur les sIgM malgré le fait que la liaison soit non-covalente. Les propriétés physico-chimiques, fonctions effectrices cytotoxiques et concentrations sériques dépendent de chaque classe et sous-classe d'anticorps.



**Figure 14:** Transcytose des IgA dimériques à travers les cellules épithéliales mucales. La chaîne J des IgA se fixe au récepteur d'immunoglobuline polymérique (pIgR) au pôle basal pour que le complexe soit endocyté dans des vésicules à clathrine, puis dirigé vers le pôle apical pour un relargage d'IgA sécrétoires (sIgA) dans le lumen. Ces sIgA emportent une partie du pIgR, appelé composant sécrétoire. Source : [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Transcytosis\\_of\\_dimeric\\_IgA\\_and\\_free\\_pIgR.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Transcytosis_of_dimeric_IgA_and_free_pIgR.jpg)

L'idiotype<sup>181</sup> caractérise la spécificité et les propriétés de liaison du paratope avec l'épitope, unique pour les anticorps produit par le même plasmocyte. Il est défini par la séquence protéique des CDR résultant d'un réarrangement de gènes codant les HC et LC et d'hypermutations somatiques. L'ensemble des marqueurs idiotypiques spécifiques d'un anticorps sont reconnus par des anticorps anti-idiotypes, selon la théorie du réseau idiotypique de Jerne<sup>182</sup>, prix Nobel en 1984. Si les idiotopes d'un anticorps sont reconnus par les récepteurs membranaires de lymphocytes B (BCR), alors les LB sécrètent des anticorps anti-idiotypes. En revanche, si un anticorps reconnaît les idiotopes d'un BCR, alors les LB sont activées en absence de stimulation antigénique. Cette théorie est directement en lien avec celle de la sélection clonale<sup>171</sup> qui détermine l'activation et la prolifération d'un type cellulaire, notamment les LB en plasmocytes, pour produire un type d'anticorps sélectionné après reconnaissance de l'antigène. En effet, dans le deuxième cas, les LB activées se différencient en plasmocytes afin de produire des anticorps avec un idiotope différent, issu d'un processus appelé maturation par affinité.

L'allotype<sup>183</sup> est quant à lui un marqueur allélique de variation individuelle, exprimant le polymorphisme génétique des régions constantes codant la HC et LC. Les variants allotypiques rencontrés dans la population sont sur les chaînes  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\kappa$ , respectivement désignés Am, Gm et Km. L'implication biologique de ces variants dans la réponse immunitaire a été peu étudiée et il n'existe pas à ce jour de consensus sur la protection médiée par les allotypes. En effet, il semblerait que des enfants présentant le variant Km(1) positif ont une meilleure réponse anticorps après une immunisation avec le vaccin pertussis-*H. influenza* type b (Hib)<sup>184</sup> alors que chez des adultes Km(1) positif, le taux d'anticorps est diminué après une immunisation à Hib et méningocoque C<sup>185</sup>.

### c. Caractéristiques des isotypes et propriétés fonctionnelles

Les IgG<sup>183</sup> représentent la classe d'anticorps la plus abondante, entre 70 à 80%, parmi les 5 isotypes mais sont également les protéines majeures du sang, 15 à 20% des protéines sériques totales, correspondant à 10 à 15 g/L. Ils sont toutefois libérés dans les muqueuses par diffusion passive à travers les cellules endothéliales et épithéliales, phénomène appelé transsudation, ou via le transporteur néonatal FcRn. Chaque isotype est présent en différente proportion, les IgG1 représentent 7 g/L de protéines dans le sang soit 60% des 4 sous-types d'IgG, les IgG2 4 g/L soit 32%, les IgG3 et les IgG4 0.5 g/L soit 4% (**Fig.19**). A la surface mucoale, on retrouve des IgG1 en quantité, puis des IgG2 et IgG4 en moindre concentration et enfin des IgG3 en faible concentration. Les IgG1, IgG2 et IgG4 ont une durée de vie longue d'environ 21 jours et de 7 jours pour les IgG3. Les IgG1 et IgG4 sont massivement transférés à l'enfant à cause de leur forte affinité avec le FcRn alors que les IgG3

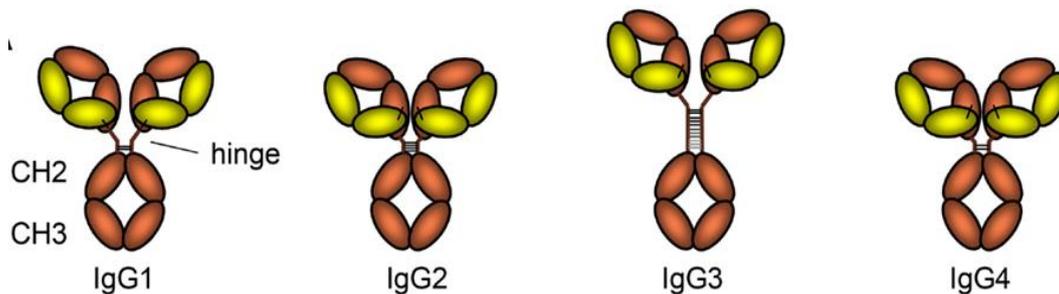
et IgG2 le sont moins (**Fig.15**). L'efficacité du taux de transfert des IgG anti-pertussis maternels peut atteindre 200%, alors qu'il n'est que de 70% pour les streptocoques B<sup>186</sup>. Les monomères d'IgA sériques représentent 10 à 20% des immunoglobulines sériques soit 2 à 3 g/L des protéines totales dans le sérum. Le sous-type IgA1 est majoritaire dans le sang ( $\approx 80\%$ ) alors que les formes dimériques sIgA1 et sIgA2 sont présents en quantité équivalente dans les sécrétions au niveau des muqueuses respiratoires, digestives, urinaires et génitales. Ils sont également présents dans le lait maternel et sont transférés passivement pendant l'allaitement, offrant une protection humorale au nouveau-né. Il existe également des formes plus rares, trimériques et tétramériques d'IgA, exposées dans les sécrétions mucosales. Les IgM sériques circulent à la concentration de 1.5 g/L de sang et représentent 5 à 10% des immunoglobulines du sang. Les sIgM ont une espérance de vie très courte, de 5 à 8 jours chez l'Homme et de 8 à 48 h chez la souris. Les IgD et IgE sont peu présentes dans le sang, respectivement  $<30$  mg/L soit 0.25% des immunoglobulines sériques et  $< 1$  mg/L soit 0.05% et ont tous deux une durée de vie très courte, entre 2 à 3 jours.

	IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
<b>General</b>								
Molecular mass (kD)	146		146		170		146	
Amino acids in hinge region	15		12		62 <sup>a</sup>		12	
Inter-heavy chain disulfide bonds	2		4 <sup>b</sup>		11 <sup>a</sup>		2	
Mean adult serum level (g/l)	6.98		3.8		0.51		0.56	
Relative abundance (%)	60		32		4		4	
Half-life (days)	21		21		7/~21 <sup>a</sup>		21	
Placental transfer	++++		++		++/++++ <sup>a</sup>		+++	
<b>Antibody response to:</b>								
Proteins	++		+/-		++		++ <sup>b</sup>	
Polysaccharides	+		+++		+/-		+/-	
Allergens	+		(-)		(-)		++	
<b>Complement activation</b>								
C1q binding	++		+		+++		-	
<b>Fc receptors</b>								
FcγRI	+++ <sup>c</sup>	65 <sup>d</sup>	-	-	++++	61	++	34
FcγRIIa <sub>H131</sub>	+++	5.2	++	0.45	++++	0.89	++	0.17
FcγRIIa <sub>R131</sub>	+++	3.5	+	0.10	++++	0.91	++	0.21
FcγRIIIb/c	+	0.12	-	0.02	++	0.17	+	0.20
FcγRIIIa <sub>F158</sub>	++	1.2	-	0.03	++++	7.7	-	0.20
FcγRIIIa <sub>V158</sub>	+++	2.0	+	0.07	++++	9.8	++	0.25
FcγRIIIb	+++	0.2	-	-	++++	1.1	-	-
FcRn (at pH < 6.5)	+++		+++		++/++++ <sup>a</sup>		+++	

**Figure 15:** Tableau récapitulatif des propriétés fonctionnelles en fonction des différents isotypes d'IgG humains. Source : Vidarsson et al., 2014.

La production d'IgG1 est souvent associée à celle des IgG3 qui est induite en présence de protéines exogènes solubles ou membranaires, alors que les IgG2 sont généralement produites en réponse à un stimulus de type antigène polysaccharidique. Les IgG4, ainsi que les IgE, reflètent une exposition chronique à des protéines allergisantes et s'intègrent dans un contexte inflammatoire. Il est à

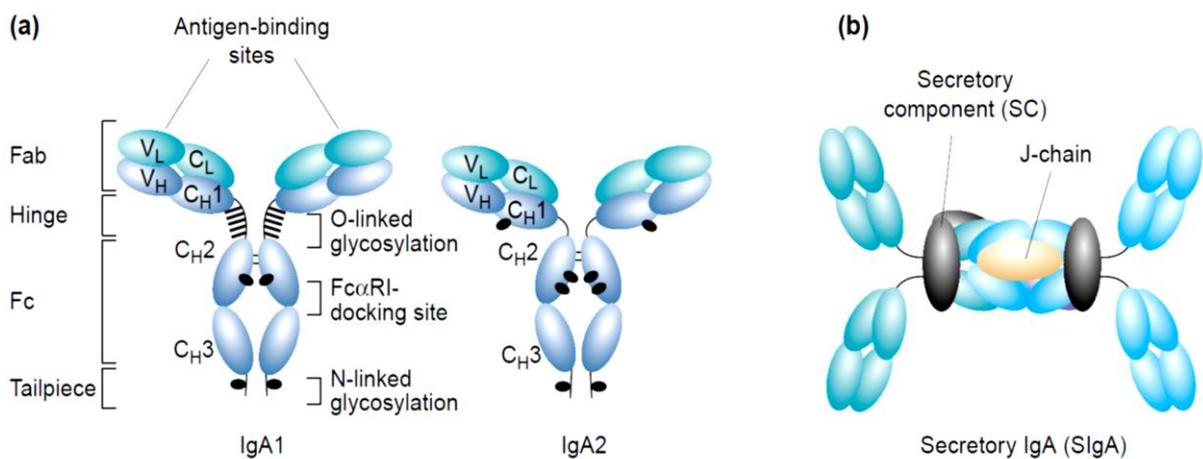
noter que les IgG4 sont en général conjointement secrétées avec les IgG1. Les déficits immunitaires humoraux (DIH) sont les plus fréquemment rencontrés,  $\approx 70\%$ , parmi les nombreux déficits immunitaires primitifs et se manifestent par des symptomatologies hétérogènes en lien avec la gravité du déficit. En effet, le déficit peut être partiel et sélectif, ne concernant que certains isotypes, ou total. Une carence en IgG2, parfois associée avec un déficit en IgG4, peut rendre plus susceptible aux infections respiratoires causées par des bactéries encapsulées<sup>187</sup>. De même, une déficience sélective en IgA et IgM peut rendre plus susceptible aux allergies et plus sensible aux infections microbiennes.



**Figure 16:** Représentation des 4 isotypes IgG. Tous les isotypes possèdent 3 régions constantes et 1 région variable sur la chaîne lourde et 1 région constante et 1 région variable sur la chaîne légère. La région charnière (hinge) varie selon l'isotype. Source : issu de Vidarsson et al., 2014.

Les IgG ont une structure globale semblable mais présentent des particularités propres qui affectent la fonctionnalité, l'affinité aux récepteurs membranaires et autres ligands en fonction des différents isotypes<sup>183</sup>. Les IgG3 ont un poids moléculaire de  $\approx 170$  kDa alors que les autres isotypes sont plus légers,  $\approx 150$  kDa. La longueur de la région charnière (**Fig.16**) de l'IgG1 permet une certaine flexibilité des Fab, alors qu'une région plus courte est associée à une charnière plus rigide pour l'IgG4 et surtout pour l'IgG2. La région charnière de l'IgG3 est beaucoup plus longue que celle des autres isotypes permettant une grande souplesse du Fab sur le Fc et augmentant les capacités de fixation des antigènes sur les paratopes. Certaines études ont montré l'importance de cette région sur les propriétés effectrices des différents isotypes. En effet, une ablation de cette région pour une IgG3 implique une suppression des propriétés cellulaires cytotoxiques (ADCC) mais n'affecte pas les capacités de lyse par complément (CDC)<sup>188</sup>. Il semblerait donc que la flexibilité de la région charnière joue un rôle dans la formation du complexe immun antigène-anticorps, dans la médiation de la réponse cellulaire et la réponse au complément. Les IgG3 fixent fortement les protéines du complément, les IgG2 et IgG1 également, mais les IgG4 ne sont pas capables d'activer les voies du complément (**Fig.15**).

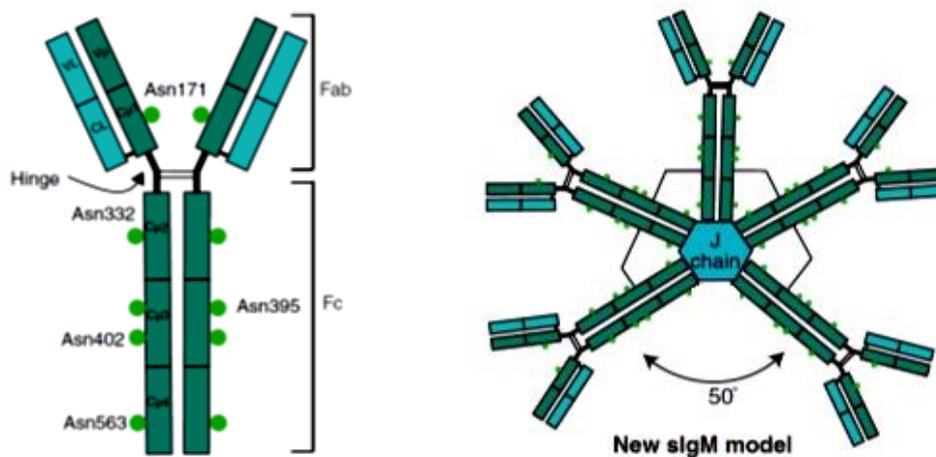
La réponse mucoale est essentiellement basée sur la réponse IgM et IgA<sup>189,190</sup>. Chez l'Homme, les formes monomériques sériques d'IgA représentent plus de 80% des formes circulantes alors qu'une fois sécrétés les IgA sont à 80% sous forme dimérique (**Fig.17**). Il est à noter que la forme sérique circulante d'IgA chez la souris est majoritairement polymérique. Les sIgA, de taille 380 kDa, présents à la surface des muqueuses, ne peuvent se fixer au récepteur Fc $\alpha$ R associé en raison de l'encombrement stérique de la forme dimérique. Ils sont alors considérés comme des molécules aux propriétés non-inflammatoires qui bloquent l'adhérence des pathogènes aux cellules épithéliales, agglutinent les micro-organismes, permet l'élimination des complexes immuns et neutralisent les toxines. Les IgA ne présentent pas de site de fixation au composant C1q du complexe protéique du complément, n'ont donc pas la capacité d'induire la voie classique du complément. Cependant, il a été montré que les formes glycosylées des IgA permettraient d'activer la voie lectine du complément<sup>191</sup> et la forme polymérique la voie alternative du complément<sup>192</sup>.



**Figure 17:** (a) Représentation des 2 isotypes d'IgA monomériques retrouvés dans le sang. Les domaines constants sont notés C<sub>x</sub> et les domaines variables sont notés V<sub>x</sub>. Les chaînes lourdes (V<sub>H</sub> et C<sub>H1</sub> à C<sub>H3</sub>) sont représentées en bleu et les chaînes légères (V<sub>L</sub> et C<sub>L</sub>) en vert. Les fragments Fab, Fc et la région charnière (hinge) sont précisés ainsi que les sites de N- et O-glycosylation et la zone de fixation au récepteur. (b) Représentation du dimère IgA sécrété (sIgA) au niveau des muqueuses par transcytose. Les dimères sont reliés entre-eux par la chaîne J et le composant sécrétoire. Source : Van Egmond et al., 2001.

Les IgM sont les premiers anticorps à être produit dans l'organisme (dès la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation) et lors d'une infection<sup>193</sup>. Ils sont présents sous la forme de monomères,  $\approx$  180 kDa, ancrés à la membrane des lymphocytes B et sont sécrétés de la même façon que les sIgA, via la chaîne J, qui assemble la forme circulante en pentamère, et le pIgR au niveau des muqueuses (**Fig.18**). Dans le sang, les IgM peuvent agglutiner de façon efficace les microorganismes grâce à leur groupements glycosylés sans impliquer leur paratope. En absence de chaîne

J, les monomères s'agrègent en hexamère qui fixe plus efficacement les protéines du complément que la forme pentamère. Les IgM pentamériques sont transcytosées de façon moins efficace que les IgA dimériques à cause de leur taille,  $\approx 970$  kDa, et sont présentes en quantité moindre que les sIgA à la surface des muqueuses. Les IgM présentent de multiples points de N-glycosylation et un site de fixation à la protéine du complément C1q sur la région CH3. Par ailleurs, les IgM activent le complément de façon plus efficace que les IgG.



**Figure 18:** Représentation d'un monomère d'IgM (à gauche) et d'un pentamère d'IgM (à droite). Les chaînes lourdes sont représentées en vert et les chaînes légères en bleu. Les sites de N-glycosylation sont symbolisés par des points verts. Source : Blandino et al., 2019.

Les IgD, de taille  $\approx 185$  kDa, sont exprimées à la surface des LB activés et matures où ils participent à la formation du BCR. Leur activité a longtemps été inconnue, mais il a été montré récemment que les IgD peuvent se fixer aux basophiles et mastocytes afin d'induire une sécrétion de facteurs antimicrobiens et pro-inflammatoires (cathélicidines, IL-1, IL-4) à la muqueuse respiratoire.

Les IgE, comme les IgM, ne possèdent pas de région charnière flexible comme les IgG, IgA et IgD mais plutôt un domaine rigide qui limite la motilité des Fab sur le corps Fc. De plus, les IgE sont des anticorps fortement glycosylés, ce qui rigidifie davantage la structure de ces anticorps. La structure des régions et la glycosylation des IgE ont un impact sur l'interaction avec l'antigène et les récepteurs cellulaires, permettant une autorégulation de la réponse inflammatoire résultante. Leur rôle de défense contre les infections parasitaires est bien connu mais leur implication dans les infections bactériennes est encore sommaire.

## 2. Expression génétique des immunoglobulines

### a. Recombinaison somatique des gènes V(D)J

Il existe 3 locus chromosomiques distincts chez l'Homme, responsables de l'expression de la HC, de la LC $\lambda$  et la LC $\kappa$ . Ces loci sont composés de nombreux segments de gènes codant la région constante (C) et la région variable (VDJ). Les gènes V codent la région variable, les gènes D et J sont responsables de la diversité et de la jonction de la région variable. La HC résulte de l'expression des gènes VDJC, alors que la LC celle des gènes VJC<sup>194</sup>. Comme il existe de multiples copies de ces segments de gènes, différentes combinaisons sont possibles, offrant une multitude d'anticorps avec différents paratopes produits, on parle de répertoire d'anticorps. Les LB et LT immatures migrent vers les organes lymphoïdes primaires pour initier un réarrangement génétique aléatoire afin d'amorcer leur maturation. La formation d'un IgM ou IgD est donc le produit résultant d'un réarrangement génétique et d'un épissage, respectivement, VDJC $\mu$  ou VDJC $\delta$  pour la HC et de VJC $\kappa$  ou VJC $\lambda$  pour la LC. Les LB arborent des IgM de surface au stade immature et une combinaison d'IgM et d'IgD à un stade de différenciation plus avancé.

### b. Hypermutations somatiques et maturation d'affinité

Lorsque les lymphocytes B naïfs présentent une immunoglobuline de surface fonctionnelle pour former le BCR, ils migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour subir des mutations ponctuelles dans les segments de gènes V. Les mutations délétères seront contre-sélectionnées alors que les mutations bénéfiques subissent des contrôles d'affinité. Les cellules présentant un variant avantageux subissent une maturation d'affinité, qui consiste à introduire des mutations dans les CDR et FR des régions variables de l'anticorps afin de produire une grande variété de récepteurs<sup>195</sup>.

### c. Commutation isotypique

La commutation isotypique<sup>195</sup> ou commutation de classe est un changement d'isotype d'immunoglobuline. Lorsque les IgM monomériques et IgD membranaires présents à la surface des lymphocytes B naïfs se lient à un antigène, les lymphocytes sont activés et changent d'isotypes, d'IgM/IgD à IgG, IgA ou IgE par un mécanisme

de recombinaison de classe ou CSR. L'affinité et la spécificité antigénique du paratope, exprimées par la région variable, sont conservées, alors que les fonctions effectrices portées par le fragment Fc sont différentes. Autrement-dit, seules les régions constantes seront modifiées. La production de ce nouvel isotype d'anticorps dépende du LB stimulé.

Cette opération est modulée par l'expression de certaines cytokines<sup>196</sup> et a pour but de favoriser la production de certains isotypes. Par exemple, les cytokines sécrétées par des lymphocytes de type Th2 induisent préférentiellement la production d'IgG1, IgG4 et d'IgE, alors que celles de type Th1 induisent plutôt les IgG2a (chez la souris) et IgG3 et ceux de type Treg plutôt des IgG2b (chez la souris) et IgG3.

#### **d. Modifications post-traductionnelles des anticorps : la glycosylation**

La glycosylation est un processus biochimique de maturation des protéines s'opérant dans le réticulum endoplasmique et qui consiste à ajouter des groupements glycosylés (fucosylation, sialylation, galactosylation...) sur des résidus aminés ou sur des séquences consensus (N-glycosylation, O-glycosylation). Les fonctions biologiques des anticorps sont finement modulées par la glycosylation comme la reconnaissance de l'antigène et sa fixation, le dialogue entre les différents acteurs innés et adaptatifs et la modulation de la réponse effectrice<sup>197</sup>.

Les IgG arborent un site de N-glycosylation conservé pour les différents isotypes à la position N-297 du CH<sub>2</sub>. Il existe plusieurs glycoformes associées au core central composé de groupements N-acétylglucosamine (GlcNAc) et mannose (Man) auxquels peuvent s'ajouter des groupements d'acide sialique (SiaA), fucose (Fuc) et de galactose (Gal) ou des ramifications de GlcNAc. Cette glycosylation est nécessaire pour une interaction optimale du Fc avec les récepteurs membranaires des IgG (FcγR)<sup>198</sup>. L'interaction IgG-FcγR est favorisée en l'absence de groupement fucose sur l'IgG, qui inhibe l'interaction avec FcγRIIIa d'une part, et d'autre part par la présence de groupements glycosylés sur le récepteur qui entre en interaction avec les groupements N-glycosylés de l'IgG<sup>199</sup>. La réponse à médiation cellulaire et la phagocytose sont donc favorisées. De façon opposée, il semblerait que la galactosylation sur le Fc améliore de façon significative la cytotoxicité cellulaire<sup>200</sup>. L'impact d'autres types de glycosylation sur les fonctions effectrices des IgG est encore mal connu et parfois contradictoire et nécessite davantage de recherches.

Les IgA sont également N-glycosylées sur les HC mais le profil de glycosylation diffère entre les IgA sériques, fortement sialylés, et les IgA muqueux qui le sont moins. La sialylation des IgA sériques augmente l'affinité au récepteur et améliore

la dégradation des complexes immuns sériques. Par ailleurs, la glycosylation et en particulier la sialylation, de la chaîne J est nécessaire à la dimérisation des IgA et à la fixation au pIgR. La forme monomérique d'IgM présente 5 sites de N-glycosylation et correspond à  $\approx 14\%$  du poids moléculaire global. Il a été montré que la glycosylation affecte la fonctionnalité des IgM dans la mesure où une mutation sur la position N-402 inhibe la fixation du C1q. Les 7 sites de N-glycosylation présents sur les IgE font de cette immunoglobuline la plus glycosylée parmi les 5 isotypes. Les IgD possèdent 2 sites de N-glycosylation qui semblent être requis pour la structure du Fc et la sécrétion de l'anticorps.

Outre la glycosylation bien connue sur la partie Fc des anticorps, l'existence de glycans Fab, présents sur le CH<sub>1</sub> des IgM et IgE, sur la région charnière des IgD, IgA1 et IgG3 et sur le Fv des IgG, jouerait un rôle sur la liaison antigène-anticorps, sur la durée de vie des anticorps et présenterait des effets immunomodulateurs à confirmer par des études plus approfondies<sup>201</sup>.

Une analyse structurale et fonctionnelle, notamment par l'étude des glycoformes, plus approfondie de la réponse anticorps induite lors d'une infection offrirait un nouvel axe de recherche pour la conception de vaccin plus efficace et d'immunothérapies plus ciblées<sup>202</sup>.

### **3. Complexe immunitaire et amplitude de la réponse immunitaire**

#### **a. Interaction antigène-anticorps**

Un antigène est une molécule généralement de nature protéique, polysaccharidique, lipidique ou nucléique capable d'induire une réponse du système immunitaire dont une production d'anticorps dirigés contre cet antigène. De petits fragments d'antigènes, incapables d'induire une production d'anticorps à eux seuls, sont appelés haptènes et nécessitent un porteur, molécule protéique ou polysaccharidique, pour conférer un pouvoir antigénique. Les antigènes portent plusieurs épitopes induisant une réponse humorale variée. Ils peuvent être séquentiels, dépendent de la séquence en acides aminés et sont reconnus par les lymphocytes T ou B, ou conformationnels, dépendent de la structure dimensionnelle de la protéine et sont reconnus par les lymphocytes B. On parle d'immunogénicité pour la capacité d'un antigène à induire une réponse immunitaire (un haptène est non-immunogénique). Celle-ci dépend des caractéristiques physico-chimiques et de la dose injectée. On parle d'antigénicité pour la capacité à être reconnu par le système immunitaire. Par ailleurs, on parle de valence antigénique, par analogie à la valence anticorps, pour désigner le

nombre d'anticorps capables de se fixer sur l'antigène. La réponse immunitaire humorale sous-jacente à la reconnaissance d'un antigène dépend soit directement de la stimulation des lymphocytes B, antigènes thymo-indépendants, soit par l'intermédiaire d'une présentation par les lymphocytes T, antigènes thymo-dépendants.

L'interaction entre le paratope d'un anticorps et l'épitope d'un antigène est réversible et repose sur des forces électrostatiques ou des interactions hydrophobes et hydrogène. On définit l'affinité d'un anticorps pour son antigène comme la force de liaison les reliant. Elle dépend de ces interactions chimiques mais aussi de la distribution des charges et du rapprochement stérique des 2 molécules. En parallèle, on définit l'avidité comme représentant l'ensemble des interactions non covalentes entre les 2 molécules.

### **b. Réponse primaire et secondaire, notion de mémoire immunitaire**

Lors d'un premier contact avec un agent infectieux ou un antigène, l'immunité innée non spécifique répond rapidement par l'intermédiaire de la voie cellulaire (DC, neutrophile, macrophage, cellule NK...) et humorale (peptides antimicrobiens, complément...). Dans un second temps, les cellules de l'immunité adaptative (LB, LT) perçoivent les antigènes par des récepteurs spécifiques et induisent une production d'anticorps hautement spécifiques. Les LB activés sécrètent des IgM et, suite à leur maturation en plasmocytes, sécrètent activement divers isotypes. On parle de séroconversion lorsque les anticorps anti-antigènes sont produits en quantité suffisante pour être détectables. Lors de l'activation des LB matures naïfs, la sélection clonale permet la prolifération de ce clone répondant à l'antigène et engendre 2 types de populations cellulaires, les plasmocytes qui sont des cellules sécrétrices d'anticorps dont la durée de vie est courte et les lymphocytes B mémoire qui ont la capacité de persister dans l'organisme pendant plusieurs années.

A la suite d'une deuxième exposition à ce même antigène, les LB mémoire prolifèrent et se différencient rapidement en plasmocytes. La réponse anticorps est alors plus rapide et plus intense. La vaccination se base sur le principe d'acquisition préventive d'une mémoire immunitaire durable et efficace suite à la stimulation du système immunitaire avec des immunogènes aux propriétés antigéniques.

## C. Fonctions effectrices des anticorps

Les anticorps présentent divers effets biologiques sur les pathogènes et les toxines sécrétées en présence ou en absence de cellules immunitaires ou de molécules effectrices<sup>203</sup>.

### 1. Activité dépendante des interactions avec le récepteur des anticorps

#### a. Les récepteurs FcR

Les récepteurs du fragment Fc (FcR)<sup>204</sup> des anticorps sont présents à la surface de nombreuses cellules immunitaires et leur interaction avec le Fc des anticorps induit de nombreux mécanismes phagocytaires (ADCP) ou cytotoxiques (ADCC) résultant en une destruction du pathogène et en un contrôle de la réponse inflammatoire. Ils établissent un lien entre immunité cellulaire et humorale.

Les FcR, qui appartiennent à la classe des immunoglobulines, sont définis en fonction de l'isotype du fragment Fc de l'anticorps associé. Les FcγR, FcαR, FcμR, FcεR et FcδR fixent respectivement les IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Ces récepteurs sont définis selon leur affinité avec l'anticorps, leurs propriétés effectrices et leur distribution sur les cellules immunitaires. Il existe 6 sous-types classiques de FcγR qui ont été identifiés chez l'Homme, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIIa (CD16a) et FcγRIIIb (CD16b) et un récepteur atypique nommé récepteur néonatal, FcRn<sup>205</sup>. Ce dernier est impliqué dans le transfert placentaire des IgG, dans la transcytose des IgG sériques vers le lait maternel et le transport de l'albumine et serait important pour rallonger la durée de vie des IgG et pour améliorer la transcytose bidirectionnelle des IgG et des complexes IgG-antigène au niveau des muqueuses en assurant une immunité locale<sup>205</sup>. Les FcγR possèdent des propriétés différentes variant avec la nature du ligand fixé et l'affinité pour le ligand et sont présents à la surface de différents types cellulaires induisant une réponse cellule-spécifique (**Fig.18**). L'affinité de liaison aux récepteurs est forte pour les IgG3 et IgG1 et décroît avec les IgG2 et IgG4. Le FcγRI se lie fortement aux IgG1 et IgG3 et les IgG2 ne se fixent que sur le FcγRIIa. Les activités effectrices liées aux récepteurs FcγR sont contrôlées par une boucle rétroactive inhibitrice médiée par le récepteur FcγRIIb (**Fig.19**).

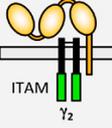
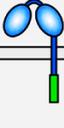
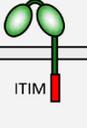
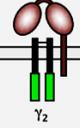
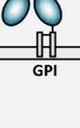
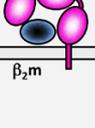
Un seul récepteur spécifique aux IgA et un seul aux IgM sont connus à ce jour, respectivement FcαRI (CD89) et FcμR<sup>193,206</sup>. Il existe également 2 corécepteurs communs aux IgA et IgM, Fcα/μR, qui fixent préférentiellement les IgM en induisant

une lyse bactérienne et le pIgR, qui fixe la chaîne J. Comme expliqué plus haut, le récepteur pIgR est responsable du transport des IgA et IgM polymériques à travers l'épithélium mucosal via la chaîne J, libérant ainsi les sIgA et sIgM entouré du composant sécrétoire dans le lumen. L'expression de ce récepteur est accrue dans un contexte pro-inflammatoire (via l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17) qui stimule la production et la sécrétion des IgA et des IgM<sup>207</sup>.

La fixation des monomères sériques IgA au récepteur Fc $\alpha$ RI permet d'initier la phagocytose par des cellules polymorphonucléaires humaines<sup>208</sup> et facilite la présentation de l'antigène aux lymphocytes T<sup>209</sup>. Les sIgA ne peuvent quant à eux se fixer au récepteur Fc $\alpha$ RI à cause de l'encombrement stérique lié au composant sécrétoire<sup>189</sup>. Toutefois, ces derniers induisent une dégranulation des éosinophiles suite à la fixation des sIgA sur le récepteur au composant sécrétoire, une dégranulation des basophiles indépendante de ce récepteur et sont également capable d'induire un stress oxydant sur les cellules polymorphonucléaires. Enfin, il est à noter que les IgA non complexées et fixées au récepteur, exercent une inhibition d'activité des Fc $\gamma$ R alors que les complexes immuns IgA-antigènes, fixée au Fc $\alpha$ RI, renforcent davantage la réponse phagocytaire médiée par les Fc $\gamma$ R<sup>210</sup>.

Les récepteurs des IgE sont au nombre de 2, Fc $\epsilon$ RI de forte affinité qui induit la dégranulation de médiateurs inflammatoires des mastocytes et basophiles et le récepteur de faible affinité Fc $\epsilon$ RII (CD23)<sup>211</sup>. Ce dernier ne fait pas partie de la famille des immunoglobulines mais fait partie de la famille des lectines de type-C et joue un rôle dans la transcytose bidirectionnelle des IgE et du complexe immun IgE-allergène, ainsi que dans l'homéostasie des IgE. Il n'existe qu'un seul type de récepteur d'IgD connu, Fc $\delta$ R<sup>212</sup>. Il est impliqué dans les interactions lymphocytes T et B afin d'améliorer l'expansion clonale des cellules T antigène-spécifiques et la production d'anticorps.

Une meilleure visibilité et compréhension des fonctions effectrices des anticorps induits suite à une vaccination ou une infection permettraient donc de développer des vaccins ou des traitements plus efficaces et de longue durée<sup>202</sup>.

Human IgG receptors							
Name	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC <sup>1</sup>	FcγRIIIA	FcγRIIIB	FcRn
CD	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A	CD16B	-
							
<b>B cell</b>	-	-	+	-	-	-	-
<b>T cell</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>NK cell</b>	-	-	- <sup>2</sup>	+ <sup>3</sup>	+	-	-
<b>Mono/Macro</b>	+	+	+/-	+ <sup>3</sup>	+	-	+
<b>Neutrophil</b>	(+)	+	+/-	+ <sup>3</sup>	-	+	+
<b>Dendritic Cell<sup>6</sup></b>	+	+	+	-	-	-	+
<b>Basophil</b>	-	+	+	-	-	+/-	-
<b>Mast cell</b>	(+)	+	-	-	-	-	NA
<b>Eosinophil</b>	-	+	-	-	-	-	-
<b>Platelet</b>	-	+	-	-	-	-	NA
<b>Endothelium</b>	-	-	-	-	-	-	+

**Figure 19:** Distribution des récepteurs humains classiques et atypique aux IgG sur les cellules. Le + indique une expression du récepteur, le (+) une expression inductible, le +/- une faible voire rare expression et le – correspond à des cellules n’exprimant pas le récepteur. NA signifie non-analysé. Source : [www.sinobiological.com/flow-cytometry-fcm-facs-antibody-verified-by-fc-receptor-blocking.html](http://www.sinobiological.com/flow-cytometry-fcm-facs-antibody-verified-by-fc-receptor-blocking.html).

## b. Activité biologique de la liaison FcR-Fc

La liaison d’un anticorps à son récepteur peut entraîner 2 types de réponse immunitaires : la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d’anticorps, ou ADCC, et la phagocytose cellulaire dépendante d’anticorps, ou ADCP.

L’ADCC<sup>213</sup> est un mécanisme de défense immunitaire qui permet d’éliminer un pathogène marqué par des anticorps, généralement des IgG et parfois des IgA et IgE, grâce à l’action de cellules de type NK essentiellement, ou plus occasionnellement des macrophages, neutrophiles et éosinophiles. Ce mécanisme est indépendant de l’activité du complément. Les cellules NK CD16<sup>+</sup> présentent à leur surface des récepteurs de type FcγRIII et la stimulation de ce récepteur induit la libération de facteurs cytolytiques comme des perforines, granulyzines et granzymes. Ces cellules sont impliquées dans l’élimination de cellules tumorales, de virus, de bactéries et de parasites. Ces derniers peuvent également être éliminés par ADCC après fixation des IgE-FcεRI aux éosinophiles en provoquant une

dégranulation de peroxidase. L'importance de ce mécanisme n'est néanmoins pas connue chez *B. pertussis*.

La phagocytose est un processus d'internalisation de pathogènes et de débris cellulaires par des cellules professionnelles phagocytaires (neutrophiles, macrophages, monocytes, éosinophiles, cellules dendritiques) dont l'efficacité microbicide ou lytique réside en la composition des granules intracellulaires (collagénase, gélatinase, radicaux libres, peroxidase, lactoferrine...) <sup>214</sup>. Il existe 2 types de phagocytose, un mécanisme indépendant d'anticorps privilégié par les cellules phagocytaires non-professionnelles <sup>215</sup> et un autre dépendant d'anticorps, la phagocytose cellulaire dépendante d'anticorps (ADCP). Les neutrophiles, monocytes et macrophages engagent le processus de phagocytose soit par des récepteurs opsoniques de type FcγR ou CR, ou non-opsoniques de type lectines. Dans le cadre d'une infection à *B. pertussis*, les granulocytes induisent la phagocytose après opsonisation du pathogène via des IgG par l'intermédiaire des récepteurs FcγRIIIa et FcγRIIIb <sup>216</sup>, alors qu'en l'absence d'anticorps opsonisants, la phagocytose se produit par le CR3 et aurait un effet bénéfique sur la survie intracellulaire de la bactérie. De plus, il a été montré que *B. pertussis* pouvait être opsonisé par les IgA <sup>146</sup> qui se fixent aux FcαRI des granulocytes initiant la phagocytose. Il existe d'ailleurs un effet synergique sur le taux de phagocytose après engagement de ces 2 types de récepteurs <sup>217</sup>. Il semblerait que les IgG anti-FHA et anti-PT corrélerent avec l'indice d'opsonophagocytose <sup>218,219</sup>, malgré qu'un fort taux d'IgG anti-FHA pourrait-être inhibiteur de ce processus <sup>101</sup>. D'autres études ont également montré le rôle des IgG anti-PRN <sup>160</sup> et des IgG anti-ACT <sup>82</sup> dans la phagocytose médiée par les neutrophiles.

## 2. Activité anticorps dépendante du complément

Se référer à l'**annexe 1** pour une description du processus de cytotoxicité dépendante de complément (CDC) avec le détail des 3 voies du système du complément, de la régulation des voies, du rôle du complément dans la protection à *B. pertussis* et les mécanismes d'évasion du pathogène.

## 3. Activité anticorps indépendante de cellules et molécules effectrices

Un anticorps est une opsonine, comme les protéines du complément, et le marquage d'un antigène par un anticorps est appelé opsonisation. Ce marquage permet de neutraliser les charges électriques présentes à la surface de la membrane

microbienne et ainsi favoriser les interactions avec les cellules immunitaires, les phagocytes, et les protéines du complément.

La neutralisation est l'une des propriétés associées à l'activité fonctionnelle des anticorps et peut s'opérer au niveau de la bactérie entière ou des protéines sécrétées telles que les toxines. Différents types d'anticorps appartiennent au groupe des anticorps neutralisants, comme les anticorps anti-toxine, anti-adhésine et (bactério-)lytique. Les anticorps anti-toxines ont la capacité d'atténuer les symptômes inflammatoires associés à la maladie et de protéger contre les réinfections ultérieures en se liant aux sites de fixation eucaryote de la toxine<sup>220-222</sup>. Il a également été montré que certains anticorps avaient la capacité d'immobiliser des virus en liant conjointement les antigènes au mucus sécrété à la surface de l'épithélium<sup>223</sup>. Par ailleurs, des anticorps anti-adhésines bactériennes de surface ont montré des propriétés d'inhibition de la motilité bactérienne<sup>224</sup> et de l'adhérence du microorganisme sur les cellules épithéliales de l'hôte<sup>225</sup>. Concernant les pathogènes intracellulaires, les anticorps peuvent intervenir à différentes étapes pour inhiber l'entrée et la sortie, étapes bien décrites pour les virus mais encore très peu pour les bactéries, et pour limiter la survie intracellulaire<sup>226</sup>. D'autres anticorps ont montré également des effets bactéricides, indépendamment de l'activité du complément. Ce type de réponse anticorps a été observé surtout chez les bactéries du genre *Borrelia*<sup>227</sup>. Cette activité est reliée à la région variable de certains IgG et IgM mais le mécanisme sous-jacent responsable des dommages membranaires observés n'a pas été encore clairement élucidé.

L'agglutination ou l'hémagglutination, encore appelé agrégation, permet aux anticorps de regrouper en paquet les micro-organismes ou les érythrocytes afin de faciliter leur élimination et de réduire le nombre de pathogènes circulants ou de globules rouges d'un groupe incompatible. Au niveau des muqueuses, les sIgA, sIgM et quelques IgG piègent les pathogènes agrégés qui seront éliminés par simple péristaltisme ou par phagocytose. Les précipitines sont des anticorps particuliers capables de précipiter les complexes immuns solubles dans le sang afin d'améliorer leur élimination par phagocytose.

Les anticorps jouent un rôle certain dans la protection contre *B. pertussis*, mais les tests mis au point pour définir les mécanismes effecteurs des anticorps ne sont pas standardisés et expliquent les nombreux rapports divergents dans l'étude de la réponse humorale induite par *B. pertussis*. Suite au manque de corrélation entre le taux sérique d'anticorps et la protection, des tests *in vitro* fonctionnels basés sur la neutralisation de toxine, l'agglutination des bactéries, l'inhibition d'adhérence, l'opsonisation et la bactéricidie ont néanmoins été mis en place pour l'étude de ces mécanismes chez *B. pertussis*. Un des premiers tests développés pour l'étude de la réponse anticorps fut la capacité des sérums à induire une inhibition du regroupement de cellules ovariennes de hamster, CHO<sup>228</sup>, provoqué par l'activité ADP-ribosylante de PT. Ce test permet d'évaluer l'activité antitoxique des sérums

immuns d'une part et la neutralisation de la PT dans les vaccins aP d'autre part. Ce test a montré que le titre obtenu en CHO clustering était corrélé au titre ELISA sérique IgG anti-PT<sup>229</sup>. Les anticorps induits après une infection ou une vaccination acellulaire ont les mêmes capacités à neutraliser la PT<sup>230</sup>, néanmoins il n'existe pas de rapport clair entre la neutralisation de toxine *in vitro* et la protection *in vivo*<sup>231</sup>. Les tests d'agglutination de bactéries développés dépendent des souches bactériennes utilisées mais ces tests ont montré une certaine corrélation entre les titres d'agglutination chez les enfants vaccinés et la protection contre une infection suite à une exposition domestique. Les titres d'agglutination corrélaient d'ailleurs avec les anticorps IgG et IgA anti-FIM induits post-immunisation<sup>232</sup>. De plus, l'inhibition d'adhérence des bactéries sur des cellules épithéliales bronchiques humaines, a pu montrer que les anticorps anti-FHA, -PT, -PRN, -Fim et -LPS<sup>233</sup> joueraient également un rôle dans l'agglutination des bactéries. Dans une étude comparative sur des sérums issus d'enfants convalescents ou immunisés avec un vaccin cellulaire, il semble que les anticorps induits après une infection naturelle interfèrent davantage sur l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales que ceux induits après une vaccination<sup>145</sup>. La bactéricidie<sup>234,235</sup> chez *B. pertussis* est également étudiée et évaluée avec le test standard de bactéricidie du sérum (SBA). Ce test a permis de montrer le rôle des anticorps anti-LPS<sup>236,237</sup>, anti-BrkA<sup>45</sup>, anti-Vag8 et anti-PRN<sup>160</sup> dans l'activation de la voie classique du complément.

Les anticorps circulants jouent donc un rôle important dans le contrôle précoce de la dissémination du pathogène, dans l'atténuation des effets toxiques et inflammatoires générés pendant l'infection et dans l'élimination efficace des complexes immuns et agrégats microbiens.

## **Sujet de thèse**

#### **IV. Problématiques et objectifs de la thèse**

La coqueluche est une maladie en recrudescence depuis quelques décennies dans les pays industrialisés, malgré une forte couverture vaccinale globale. Les causes majeures de résurgence seraient le déclin rapide de l'immunité induite après une vaccination acellulaire, comparé à une vaccination cellulaire, et une transmission asymptomatique du pathogène dans la population vaccinée diminuant l'efficacité de l'immunisation collective<sup>238</sup>.

La protection contre la coqueluche nécessite la réponse innée et adaptative et elle est optimale quand les réponses cellulaires et humorales sont engagées<sup>125</sup>. Bien que la réponse anticorps soit critique à la suite d'une vaccination, il n'a pas été possible de définir à ce jour un seuil ou un type d'anticorps attribuable à une protection contre l'infection à *B. pertussis*. Néanmoins, les mécanismes effecteurs de l'immunité humorale sont peu définis dans la littérature et l'étude de la fonctionnalité des anticorps semble davantage pertinente pour définir un corrélât de protection contre l'infection par *B. pertussis*.

L'objectif premier de la thèse était de développer un test standardisé permettant d'évaluer la fonction inhibitrice des anticorps sur la croissance de *B. pertussis*, dépendante ou indépendante de complément. Ce test a été développé et optimisé pour une application à haut-débit en petits volumes afin d'être utilisable lors d'essai clinique sur des échantillons limités. Ce test a donc été appliqué à l'étude de la réponse humorale systémique suite à une vaccination contre la coqueluche ou une infection dans différents modèles, chez la souris, chez le babouin et chez l'Homme, dans le but de déterminer un lien éventuel entre nature, quantité et fonction des anticorps.

Dans un deuxième temps, la caractérisation structurale et fonctionnelle d'anticorps monoclonaux dirigés contre un antigène majeur de *B. pertussis* permettait d'identifier des immuno-domaines en lien avec une réponse anticorps efficace contre l'adhérence du pathogène ou induisant des effets inhibiteurs, bactéricides ou bactériostatiques, sur la bactérie. L'objectif de ce travail était de mieux comprendre l'induction d'un type d'anticorps qui entrainerait un mécanisme effecteur protecteur suite à la présentation de l'antigène au système immunitaire lors d'une vaccination.

Enfin, un travail dans le modèle souris permettant de mettre en exergue l'efficacité des vaccins actuels à induire une immunité stérilisante dans les muqueuses ainsi que les mécanismes responsables de l'immunité mucoale a été abordé pour tenter d'expliquer la recrudescence de la coqueluche.

## Résultats

## **V. Mise en place d'un nouveau test d'étude de la fonctionnalité des anticorps**

Le rôle des anticorps dans la protection à *B. pertussis* a été rapidement mis en évidence lors d'études cliniques conduites sur des populations vaccinées et d'études de cas de familles infectées<sup>105,159,161</sup>. Les modèles animaux murins et simiens ont également permis d'identifier des anticorps protecteurs de l'infection et de la maladie, dirigés contre des antigènes contenus dans les vaccins<sup>137,142,239</sup>. Néanmoins, le taux sérique d'anticorps évalué par la méthode standard d'ELISA n'a pas permis d'établir un lien direct avec la protection contre l'infection. C'est pourquoi, il a été développé de nombreux tests visant à évaluer les fonctions effectrices des anticorps, en parallèle de leurs capacités de fixation à l'antigène et leur quantification, basées sur (1) la neutralisation de toxine<sup>230,240</sup>, (2) l'inhibition d'adhérence sur cellules épithéliales<sup>145,241</sup>, (3) l'agglutination des bactéries<sup>242,243</sup>, (4) l'opsonophagocytose<sup>218,219</sup> et (5) la lyse par complément<sup>244,245</sup>.

La lyse par complément est un mécanisme essentiel de la réponse humorale et peut s'évaluer par une technique standard qui mesure la capacité des anticorps du sérum à induire une lyse bactérienne, ce test est appelé le test de bactéricidie du sérum (SBA)<sup>246</sup>. C'est une technique chronophage et fastidieuse qui ne peut être transposée à des études de grandes échelles. De plus, appliquée à l'étude des anisera pertussiques, la technique nécessite plusieurs jours de délai pour obtenir des résultats. Un des premiers objectifs de la thèse aura donc été de mettre au point un test à application haut-débit pour caractériser la fonctionnalité des anticorps bactéricides et bactériostatiques dépendants ou non de complément.

Ce travail a fait l'objet d'une publication de résultats scientifiques dans le journal *Frontiers in Microbiology*, dans la section « Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy », Thiriard et al., 2019.

### **A. Publication - Développement et standardisation d'un test d'inhibition de croissance de *Bordetella pertussis* à haut débit**

# Development and standardization of a high throughput *Bordetella pertussis* growth-inhibition assay

Anaïs M. Thiriard<sup>1</sup>, Dominique Raze, Camille Locht

<sup>1</sup>INSERM U1019 Centre d'Infection et Immunité de Lille (CIIL), France

**Submitted to Journal:**

Frontiers in Microbiology

**Specialty Section:**

Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy

**Article type:**

Original Research Article

**Manuscript ID:**

480940

**Received on:**

15 Jun 2019

**Revised on:**

20 Sep 2019

**Frontiers website link:**

[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

In review

#### Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

#### Author contribution statement

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: AT, DR and CL. Performed the experiments: AT. Contributed materials/analysis tools: AT, DR and CL. Performed data analysis: AT, DR and CL. Wrote the paper: AT, DR and CL.

#### Keywords

Bordetella, growth-inhibition assay, antibody, complement, antibiotic

#### Abstract

Word count:231

*In review*

Bordetella pertussis, the main causative agent of whooping cough, is a reemerging pathogen, and recent vaccine-resistant strain outbreaks and emergence of macrolides-resistant strains raised new concerns for control of the disease. New vaccines and potentially new antibiotics are thus needed. B. pertussis is tedious to culture and requires several days of growth to count isolated colonies on agar-based media, making large-scale screening of new anti-B. pertussis compounds or functional evaluation of large sample sizes of immune sera difficult. Here, we developed a scalable, rapid, high-throughput luminescence-based Bordetella growth inhibition assay (BGIA) to quantify surviving bacteria after treatment with anti-B. pertussis compounds. A strong correlation between luminescence and colony-forming units ( $r^2=0.9345$ ,  $p<0.0001$ ) was found and the BGIA showed high sensitivity and reproducibility. We demonstrate here that the BGIA can be used to quantify resistance of B. pertussis to antibiotics, sensitivity to complement and to human serum in an easy-to-operate and fast manner. We have optimized the assay and assessed the effects of differences between B. pertussis strains and growth

conditions on serum and complement sensitivity and uncovered complement-independent antibody-mediated inhibition of *B. pertussis* growth. The BGIA can thus effectively be implemented for large-scale serum studies to deeper investigate anti-*B. pertussis* immune responses at a functional level, as well as for screening of *B. pertussis* strains for their resistance to antibiotics or complement, and for high-throughput screening of novel anti-*B. pertussis* compounds.

### Contribution to the field

*Bordetella pertussis* is the main causative agent of whooping cough, a serious and highly contagious respiratory disease that is one of the major causes of childhood morbidity and mortality worldwide. Re-emergence of pertussis is a global public health threat and rising concerns about vaccine- and antibiotic-resistance prompts the scientific and medical community to seek improved control measures, which may require new vaccines and antibiotics. The development of new tools to combat pertussis would greatly benefit from robust assays to assess induced antibody functionality and antibiotic susceptibility. In this study, we propose a scalable high-throughput assay based on luminescence readout, as an alternative to the classical colony-forming units counting to assess *Bordetella* growth inhibition. We demonstrate that this growth inhibition assay can be used to quantify resistance of *B. pertussis* to antibiotics, sensitivity to complement and to human serum. Moreover, we uncovered complement independent antibody-mediated inhibition of *B. pertussis* growth. Deeper investigation of anti-*B. pertussis* immune responses at a functional level have rarely been studied and this assay could be a useful tool to decipher immune correlates of protection against infection or disease, which are still unknown for pertussis.

### Funding statement

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and in part by the PERISCOPE project, which has received funding for the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking under grant agreement No 115910. This Joint Undertaking receives support from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program, the European Federation of Pharmaceutical Industries and the Associations, and Bill & Melinda Gates Foundation. A.T. was supported by a fellowship for Inserm/Région Haut-de-France.

Ethics statements - Studies involving animal subjects

Generated Statement: No animal studies are presented in this manuscript.

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

Data availability statement

Generated Statement: All datasets generated for this study are included in the manuscript/supplementary files.

In review

# Development and standardization of a high-throughput *Bordetella pertussis* growth-inhibition assay

Anaïs Thiriard<sup>‡</sup>, Dominique Raze<sup>\*‡</sup>, Camille Locht<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

\*Correspondence :

Dr. Dominique Raze

[dominique.raze@ibl.cnrs.fr](mailto:dominique.raze@ibl.cnrs.fr)

Keywords: *Bordetella*, growth-inhibition assay, antibody, complement, antibiotic

In review

## Abstract

*Bordetella pertussis*, the main causative agent of whooping cough, is a reemerging pathogen, and recent vaccine-resistant strain outbreaks and emergence of macrolides-resistant strains raised new concerns for control of the disease. New vaccines and potentially new antibiotics are thus needed. *B. pertussis* is tedious to culture and requires several days of growth to count isolated colonies on agar-based media, making large-scale screening of new anti-*B. pertussis* compounds or functional evaluation of large sample sizes of immune sera difficult. Here, we developed a scalable, rapid, high-throughput luminescence-based *Bordetella* growth inhibition assay (BGIA) to quantify surviving bacteria after treatment with anti-*B. pertussis* compounds. A strong correlation between luminescence and

colony-forming units ( $r^2=0.9345$ ,  $p< 0.0001$ ) was found and the BGIA showed high sensitivity and reproducibility. We demonstrate here that the BGIA can be used to quantify resistance of *B. pertussis* to antibiotics, sensitivity to complement and to human serum in an easy-to-operate and fast manner. We have optimized the assay and tested the effects of different *B. pertussis* strains and growth conditions on serum and complement sensitivity. We also uncovered complement-independent antibody-mediated inhibition of *B. pertussis* growth. The BGIA can thus effectively be implemented for large-scale serum studies to further investigate anti-*B. pertussis* immune responses at a functional level, as well as for screening of *B. pertussis* strains for their resistance to antibiotics or complement, and for high-throughput screening of novel anti-*B. pertussis* compounds.

## Introduction

Whooping cough or pertussis is a serious and highly contagious respiratory disease mainly caused by the gram-negative bacterium, *Bordetella pertussis* (Hewlett et al. 2014). The disease affects all age groups and is considered as one of the major causes of childhood morbidity and mortality worldwide (Hewlett and Edwards 2005). In 2014, 24.1 million pertussis cases and 160.700 pertussis-linked deaths were reported in children under the age of 5, among whom 53% were infants younger than 1 year old (Yeung et al. 2017), making this disease the most prevalent vaccine-preventable childhood disease.

The introduction of pertussis vaccination in the 1940s with whole cell pertussis vaccines (wPV) led to a significant decrease in the global pertussis burden. However, due to occasional adverse reactions, acellular pertussis vaccines (aPV) have replaced wPV in the 1990s in most high-income countries. Despite the well-established effectiveness of the both types of current vaccines, and the high global vaccination coverage (Feldstein et al. 2017), there is strong recrudescence of the disease especially in countries using aPV. Substantial vaccine pressure has led to genetic remodeling of strains circulating since the introduction of aPV, particularly of the pertactin gene (Bart et al. 2014). In addition, the recent emergence of macrolides-resistant strains (Shahcheraghi et al. 2014; Liu et al. 2017; Korgenski and Daly 1997) have raised new concerns for transmission and resurgence of pertussis.

Hence, the re-emergence of pertussis is a global public health issue. Therefore, new vaccines that trigger long-lasting and sterilizing immunity to prevent infection and transmission need to be developed (Locht 2018). In addition, alternative treatments to macrolides in exposed populations should be considered. A better understanding of the pathogenesis of pertussis, protective immunity and drug susceptibility of *B. pertussis* will be useful to define new approaches for the control of this disease.

*B. pertussis* is a tedious organism to culture and requires several days of growth before isolated colonies can be quantified on solid media. This makes high-throughput methods difficult to apply in the context of new anti-*B. pertussis* compound screening or of the analysis of anti-*B. pertussis* immune responses at a functional level. Here, we describe the *Bordetella* growth inhibition assay (BGIA), a luminescence-based method for quantification of surviving bacteria. As it is not based on genetically engineered test organisms, the BGIA can be used on any circulating strain to determine its antibiotic susceptibility and complement resistance, as well as antibody-dependent *B. pertussis* growth inhibition. Results are obtained within hours and the assay is optimized for small volumes making BGIA amendable to high throughput analyses.

## Materials and methods

### Bacterial strains and culture conditions

The streptomycin-resistant Tohama I derivative BPSM (Menozzi et al. 1994) and a clinical isolate, B1917 (Bart et al. 2010), were cultured for 2 days at 37°C on Bordet-Gengou (BG) agar supplemented with 1% glycerol and 10% defibrinated sheep blood. When required, streptomycin was added at 100 µg/ml. After growth, bacteria were harvested by scraping the plate and resuspending them in phosphate-buffered saline (PBS). The optical density at 600nm (OD<sub>600</sub>) was adjusted at a final OD<sub>600</sub>=0.1 in liquid modified Stainer-Scholte (SS) (Stainer and Scholte 1971) or Thalen-Ijssel (THIJS) (Thalen et al. 1999) medium. After 16h of incubation in an orbital-shaking incubator at 200 rpm and 37°C, the log-phased bacteria were harvested by centrifugation at 3220 x g for 10 min at room temperature. The pellet was resuspended with PBS and centrifuged in the same conditions. The washed pellet was resuspended in SS or THIJS supplemented with 15% glycerol at a final concentration of 2.10<sup>6</sup> CFU/ml. Aliquots of bacteria were stored at -80°C.

### Sera, complement sources and antibiotics

The pertussis antiserum 06/140 from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) was used in this study. When needed, serum was decomplemented by heating for 30 min at 56°C to remove endogenous complement activity. The sera were two-fold serially diluted in SS or THIJS media, ranging from 1/2 to 1/4096, and incubated with bacteria suspended in either SS or THIJS media. Alternatively, bacteria were incubated in the presence of IgG- and IgM-depleted human serum (HS), guinea pig serum (GPS) (Sigma) or baby rabbit complement (BRC) (Biorad), as exogenous complement sources, at concentrations ranging from 1% to 15%, diluted in SS or THIJS media. The HS was kindly provided by Andrew Gorry, Public Health England (PHE). Streptomycin, polymixin b, gentamicin and erythromycin were dissolved in water, nalidixic acid in 0.1 M NaOH

and chloramphenicol in ethanol. These stock solutions were then diluted in SS medium at the desired concentrations, and then two-fold serially diluted in SS media. To ensure that the solvent used to dissolve the antibiotics has no effect on bacterial growth, controls containing only the solvents and the bacteria were included in the assay and revealed no significant effect.

#### *Bordetella* growth inhibition assay (BGIA)

In each well of a white half-volume 96 wells plate (Greiner, 675075), 10 µl of media or media containing different amount of antibiotics, complement sources or serum samples was added to 10 µl of aliquoted bacteria. The plate covered with a plastic lid (Greiner, 656190) was centrifuged at 10 x g for 1 min and then incubated without shaking at 37°C. After incubation, 20 µl BacTiter-Glo (Promega, G8230) was added to each well, followed by a 10 min incubation at room temperature in an orbital plate shaker. BacTiter-Glo induces bacterial cell lysis for extraction of ATP and production of an ATP-dependent luminescent signal following the reaction between luciferin and luciferase contained within the reagent formulation. After incubation with BacTiter-Glo, the luminescence signal was read with a luminometer (Berthold Centro XS<sup>3</sup> LB 960) with the following parameters: 5 min delay by plate and 0.1 sec counting time by well. The signal was expressed in relative luminescence units (RLU). A first measurement at time 0 (t<sub>0</sub>), prior to incubation, of the wells containing only bacteria and media was performed to measure the signal corresponding to the initial bacterial inoculum and to monitor aliquot stability.

#### Colony forming units (CFU) counting

To establish a correlation between CFU counts and RLU measurements, the bacterial mixture contained in the microtiter plate well was ten-fold serially diluted in PBS, plated onto BG blood agar plates and incubated for 5 days at 37°C. After incubation, number of CFU was counted and plotted against BGIA values.

#### Analyses

Raw values expressed in RLU were normalized by calculating the percentages of bacterial survival relative to controls that contained only bacteria and media. Normalized data were plotted against different antibiotic concentrations and complement or serum dilutions to draw a bacterial growth inhibition curve. A four-parameters logistic curve (4PL) on GraphPad Prism5 was applied to normalized data to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) or half maximal inhibitory dilution (ID<sub>50</sub>) with the following equation:  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{Hillslope}))}$ . IC<sub>50</sub> and ID<sub>50</sub> represent the concentration or the dilution of the inhibitors that induced 50% bacterial growth inhibition. The coefficient of variation (CV) was calculated for each IC<sub>50</sub> and ID<sub>50</sub> replicate. The Z'

factor was calculated during the optimization step. Statistical analyses were performed with a two-tailed Student's t-test.

## Results

### RLU-CFU correlation and optimization of inoculum and culturing time

The BGIA developed here is based on bioluminescent detection of ATP produced by living bacteria under different conditions. The luminescence signal is generated through the action of luciferase on luciferin, provided externally by BacTiter-Glo, in the presence of ATP provided by metabolically active bacteria. It does not require prior transformation of the bacteria with luciferase-encoding plasmids. In an attempt to correlate RLU readings with classical CFU counting, different concentrations ranging from  $10^1$  to  $10^7$  CFU/well of the streptomycin resistant *B. pertussis* Tohama-I derivative BPSM were seeded in the wells of a white 96 wells plate. Half of the well content was read by luminescence and the other half was plated onto BG blood agar plates to count CFU (**Fig. 1A**). The intensity of the luminescence signal was proportional to the amount of living bacteria and a good RLU – CFU correlation ( $r^2 > 0.93$ ,  $p < 0.0001$ ) was found, especially starting at a concentration of  $10^3$  CFU/well and up to  $10^7$  CFU/well.

Different bacterial concentrations, ranging from  $10^3$  to  $10^7$  CFU/well, were then incubated for up to 24h in SS medium and at 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 hours of growth, luminescence was read and normalized to time 0. Luminescence increased over time with the strongest increase seen for cultures seeded at  $10^4$  or  $10^5$  CFU/well (**Fig. 1B**) up to 16h of growth. Although an increase in luminescence over time was also seen in wells seeded with  $10^3$  or  $10^6$  CFU/well up to 16h of growth, the dynamic range was not as strong as for wells seeded with  $10^4$  or  $10^5$  CFU/well. From  $10^3$  to  $10^6$  CFU/well, growth reached a maximal rate at 16 hours and then luminescence started to decrease. In wells seeded with  $10^7$  CFU/well, the maximal growth was reached after 2 hours, and luminescence decreased after 8 hours. These results indicate that the inoculum size for *B. pertussis* to obtain the optimal dynamic in this assay is from  $10^4$  to  $10^5$  CFU/well. They also indicate that *B. pertussis* growth kinetics can be followed over time in a microplate by luminescence reading. The Z' factors (Zhang et al. 1999), calculated for each bacterial concentration, were -7.3, -4.1, -0.5, 0.6, 0.7, 0.8 and 0.4, corresponding to  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  and  $10^7$  CFU/well, respectively. The assay may thus be suitable to examine the effect of compounds or other inhibitors on *B. pertussis* growth over time. Since the growth profiles between  $10^4$  and  $10^5$  CFU/well inoculum sizes were very similar, we used the  $10^4$  CFU/well inoculum size for further assays.

## Antibiotic susceptibility tested by BGIA

To assess whether the luminescence measurements can be used to evaluate growth inhibition, various antibiotics were chosen according to their properties and their mechanism of action: (i) the polypeptide polymyxin b and the two aminoglycosides streptomycin and gentamicin, as bacteriolytic antibiotics, (ii) chloramphenicol and a macrolide: erythromycin as bacteriostatic and (iii) nalidixic acid, a quinolone. These antibiotics were incubated at different concentrations with  $10^4$  CFU/well of BPSM. To allow for sufficient time for antibiotic action, the incubation was carried out for 16 hours. After luminescence reading, the values were normalized to those of the bacteria incubated without antibiotic for 16 hours. As BPSM is a streptomycin- and nalidixic acid-resistant derivative of Tohama I, it tolerated high concentrations of these antibiotics (**Fig. 2A and B**). Nalidixic acid appeared to enhance growth of *B. pertussis* at concentrations below 25  $\mu\text{g/ml}$ . However, the bacteria became sensitive to nalidixic acid at concentrations higher than 25  $\mu\text{g/ml}$ , allowing us to establish an  $\text{IC}_{50}$  at  $31.07 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$  for nalidixic acid with a calculated CV of 24%. In contrast to the two former antibiotics, polymyxin b strongly inhibited *B. pertussis* growth even at very low concentrations, the  $\text{IC}_{50}$  was  $0.08 \pm 1.06 \mu\text{g/ml}$  and the CV 3% (**Fig. 2C**). Chloramphenicol (**Fig. 2D**) and erythromycin (**Fig. 2E**) act both by inhibiting protein synthesis but the inhibition profile was different, with a substantially lower  $\text{IC}_{50}$  for erythromycin than for chloramphenicol, respectively  $0.035 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$  and  $0.23 \pm 1.04 \mu\text{g/ml}$ . The calculated CV for chloramphenicol was 5% and 4% for erythromycin. Gentamicin had an  $\text{IC}_{50}$  ( $9.7 \pm 2.7 \mu\text{g/ml}$ ) higher than chloramphenicol but lower than nalidixic acid (**Fig. 2F**) and a CV of 7%. The calculated  $\text{IC}_{50}$  determined by the BGIA were compared with the minimal inhibitory concentrations (MIC) determined by standard assays and were found to be in the same range for all antibiotics tested (**Table 1**). Altogether these data show that the luminescence measurements can be used in a BGIA for testing *B. pertussis* susceptibility to antibiotics and to determine  $\text{IC}_{50}$  through S-shaped fitted curves (not shown).

## Effect of serum on *B. pertussis* growth

To determine whether the luminescence-based BGIA may be useful to analyze the ability of immune serum to restrict *B. pertussis* growth,  $10^4$  CFU/well of *B. pertussis* BPSM was incubated with serial two-fold dilutions of the pertussis antiserum NIBSC 06/140, a standard human pertussis immune serum, for 2, 4, 8, 12 or 16h. After incubation, luminescence was measured and the RLU values were normalized for each time point to control bacteria grown without anti-serum. Plateau values were reached for all time points at the dilution of 1/512 (**Fig. 3**) without significant differences between each incubation time. The S-shaped nature of the curves allowed us to calculate  $\text{ID}_{50}$ s. For short time incubations, the  $\text{ID}_{50}$  was between the serum dilution 1/16 and 1/32 (for 2 h incubation), and between 1/32 and 1/64 (for 4h incubation). After 8h and up to 16h incubation, the  $\text{ID}_{50}$  values were similar and

ranged between a 1/64 and 1/128 dilution. The calculated CV were 14%, 9%, 11%, 3% and 13% for the ID<sub>50</sub> after 2h, 4h, 8h, 12h, and 16h incubation, respectively. There was no statistical difference between the growth inhibition profile for 4 hours or 8 hours of serum incubation with *B. pertussis*. Thus, bacterial growth inhibition can be followed at early (2h - 4h) and late (8h - 12h - 16h) time points. We reasoned that bactericidal activity mediated by antibody and complement is a fast-occurring process and therefore carried out all our subsequent experiments with a 4h incubation time.

#### Effect of complement on *B. pertussis* growth

Complement-mediated killing is an important anti-bacterial effector mechanism, and different *B. pertussis* strains may have developed various complement evasion mechanisms (for review, see Thiriard et al. 2018). To evaluate the role of complement in *B. pertussis* growth inhibition, we performed the BGIA on IgG- and IgM-depleted human serum (HS), on a commercial guinea pig serum (GPS) and on a baby rabbit complement (BRC). However, sensitivity of *B. pertussis* to complement may vary from strain to strain (Brookes et al. 2018) and according to the growth conditions (Luu et al. 2017). We therefore compared the laboratory strain BPSM to the more recent clinical isolate B1917 each grown in liquid SS or THJS medium. Different concentrations, ranging from 1% to 15% of HS (**Fig. 4A**), GPS (**Fig. 4B**) and BRC (**Fig. 4C**) were incubated for 4h with 10<sup>4</sup> CFU/well BPSM or B1917 grown in SS or in THJS medium. After normalization of the RLU readings to those of the control bacteria grown in media without complement, for each complement source BPSM appeared more sensitive to complement than B1917. Whereas 30-50% growth inhibition was observed for B1917 in the presence of 1-15% HS, growth inhibition reached 60-80% for BPSM at the same concentrations (**Fig. 4A**). There was no difference between B1917 and BPSM grown in SS or in THJS medium towards sensitivity to HS. Similarly, growth inhibition reached a maximum of 30-40% with up to 15% of GPS for B1917 and 80-90% growth inhibition with 15% of GPS for BPSM (**Fig. 4B**). Sensitivity to GPS grown in SS or THJS medium was similar for B1917, whereas BPSM grown in THJS medium was significantly more sensitive to GPS than BPSM grown in SS medium. Growth inhibition of B1917 mediated by BRC reached a maximum of 10%, whereas inhibition of BPSM growth reached 40% already at a concentration of 1%. No statistical difference between the liquid culture conditions was observed for either strains (**Fig. 4C**). These results indicate that the BGIA can be used to measure differences in complement sensitivity between different *B. pertussis* strains, between growth conditions and between complement sources.

### *Complement-independent and complement-dependent antibody-mediated inhibition*

As *B. pertussis* sensitivity to complement can vary between strains, growth conditions and the complement source used, we examined the effect of the standard anti-pertussis serum NIBCS (06/140) on BPSM and B1917 grown either in SS or in THJS medium. Furthermore, we compared the effect of heat-inactivated NIBCS (06/140) to that of non-heat-inactivated NIBCS (06/140), in order to distinguish between complement-independent and complement-dependent *B. pertussis* growth inhibition, respectively.  $10^4$  CFU/well BPSM or B1917 grown in either medium was incubated for 4 hours with two-fold serial dilutions of heat-inactivated or non-heat-inactivated NIBCS (06/140) serum, ranging from 1/2 to 1/4096. Both strains grown in either medium were sensitive to NIBCS (06/140) in a dose-dependent manner (**Fig. 5A**). Whereas for BPSM grown in THJS medium almost 100% growth inhibition was obtained at a 1/32 dilution of NIBCS (06/140), maximum growth inhibition for BPSM grown in SS medium was obtained only at a 1/8 dilution of NIBCS (06/140). The  $ID_{50}$  calculated for the growth inhibition curves upon NIBCS (06/140) incubation for BPSM in SS or THJS media and B1917 in SS or THJS media were  $52 \pm 9$ ,  $176 \pm 20$ ,  $47 \pm 12$  and  $125 \pm 7$ , respectively. The calculated CV were 10%, 6%, 5% and 10%, respectively. For both strains, bacteria grown in THJS media were more sensitive to complement-dependent antibody-mediated growth inhibition than bacteria grown in SS media. Moreover, while the shape of the inhibition curves was similar between BPSM and B1917 grown in THJS, they were significantly different between the two strains when grown in SS, showing a higher complement resistance of B1917 than BPSM.

When the NIBCS (06/140) serum was heat inactivated, no growth inhibition was observed for B1917 (**Fig. 5B**) grown in SS or THJS media. However, slight growth inhibition was observed for BPSM grown in SS medium at the lower serum dilutions, from 1/2 to 1/8. A significantly stronger growth inhibition was seen for BPSM grown in THJS medium, up to a dilution of 1/128.

The areas under curve were calculated for non-heat-inactivated NIBCS (06/140) serum and heat-inactivated serum for each growth condition and bacterial strain, allowing us to quantitatively compare the sensitivity of the two strains grown in the different media (**Fig. 5C**). Growth inhibition mediated by complement-dependent antibody-mediated activity was stronger in THJS-grown bacteria compared to SS-grown bacteria, and B1917 was significantly more resistant than BPSM when grown in THJS medium. Significant complement independent growth inhibition by the antibodies was only observed for BPSM grown in THJS medium, which was significantly lower than in the presence of complement. Thus, B1917 appeared to be more resistant than BPSM to complement-independent antibody-mediated growth inhibition, in particular when grown in THJS medium.

## Discussion

Because of the recent outbreaks of *B. pertussis* infections attributed to strain evolution, non-optimal immune responses, fast waning immunity (Mooi et al. 2014) and raising concerns about vaccine- and antibiotic-resistance, development of robust assays to assess induced antibody functionality and antibiotic susceptibility may be helpful to develop improved vaccines and treatments. However, existing assays rely on CFU counting as readout of bacterial survival, which is tedious, time-consuming and labor-intensive, thus making this readout difficult to apply for large-scale studies or high-throughput screening.

In this study, we propose a scalable high-throughput assay based on luminescence readout, as an alternative to the classical CFU counting to assess bacterial growth inhibition. The BGIA is sensitive, reproducible, fast and easy-to-operate and was optimized for small volume samples. We demonstrate here that *B. pertussis* is able to grow in microplates and that growth can be followed over time by luminescence reading. We also demonstrate that the BGIA can be used to measure *B. pertussis* growth in the presence of antibiotics, complement or immune serum and document the effect of the bacterial growth conditions and strains in complement dependent and –independent antibody-mediated growth inhibition. One of the strengths of this assay over previously described luminescence-based assays resides in the fact that the BGIA described here can be easily used on any *B. pertussis* isolate, without prior need for transformation with luciferase-encoding plasmids, as the enzyme and substrate, except for ATP are exogenously provided by BacTiter-Glo.

While a very strong correlation was found between CFU counting and RLU measurements ( $r^2=0.9345$ ,  $p< 0.0001$ ), both assays do not necessarily measure the same effects of the antibacterial compounds. Even though, growth inhibition can be followed overtime by OD reading to provide information on lytic and static inhibitor effects, a second step of CFU plating and counting on solid media, after the incubation with anti-bacterial compounds, is required to measure bactericidal activities of these compounds. In contrast, the BGIA described here measures both bactericidal and bacteriostatic activities of anti-bacterial compounds in a one-step protocol. As this BGIA is an ATP-based assay with a luminescent readout to measure bacterial growth by the ATP content, an increase or decrease in luminescence is the result of an increase or decrease in ATP levels produced by metabolically active bacteria. This therefore indicates bacterial growth or growth inhibition. Unlike CFU-based methods or OD measurements, this luminescence-based assay can be conveniently used to follow bacterial growth over time, without the need for a second step of bacterial growth on solid media.

The protocol of the BGIA described here is simple and requires no washing step or medium removal. It is fast, as direct luminescence acquisition requires less than 2 minutes per plate. It is highly reproducible and sensitive, as the CV of the calculated

ID<sub>50</sub> or IC<sub>50</sub> were usually low. The BGIA is performed in a white half-area 96-wells microplate to reduce light crosstalk between neighboring wells. Ideally, luminescence should be read on the top of the plate with a microplate reader (Berthold, Centro XS3 LB 960) providing better signal-to-noise ratios and sensitivity compared to a bottom reading (BMG Labtech, POLARstar Omega) (data not shown). The Z' factor corresponding to 10<sup>4</sup> CFU/well was > 0.5, indicating that the BGIA is robust for high-throughput analysis. Moreover, the BGIA can be performed in small volumes, i.e. 10 µl per well of tested antibacterial compounds. This is particularly interesting for testing of precious serum samples, as the amount of serum is often a limiting factor in human and animal studies. Although this study describes results obtained with 96-well plates, for some experiments we have also used 384-well plates with similar results (data not shown). This luminescence-based assay makes use of the commercially available BacTiter-Glo (Promega), which contains standardized reagents enabling an enzymatic reaction catalyzed by a recombinant firefly luciferase between a beetle luciferin and intracellular ATP extracted by a non-ionic surfactant. This reaction generates oxyluciferin and photon emission that directly depends on ATP input and therefore is proportional to the number of viable and metabolically active bacteria. As the bacterial metabolism strongly depends on culture conditions and media used, we have standardized them and found that different strains (e.g. BPSM and B1917 used in this study) may behave differently when grown in two different media, such as the SS and the THJS media. As the BGIA can conveniently be used to compare serum samples for their bacterial growth inhibition properties, it is therefore essential that culture conditions are carefully controlled. Importantly, neither serum nor compounds present in SS or THJS media appear to interfere with luminescence reading (data not shown).

After standardization we found that inoculum sizes of *B. pertussis* ranging from 10<sup>3</sup> to 10<sup>6</sup> CFU/well were able to multiply ten-fold over 12 to 16h incubation, whereas with an inoculation of 10<sup>7</sup> CFU/well growth stopped already after only 2h of incubation. Inoculum sizes between 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup> CFU/well appeared to be ideal to measure growth inhibition by antibiotics, complement and serum samples, suggesting an optimal bacterial concentration input to reach the best growth dynamic. Although there is so far no evidence of quorum sensing in *B. pertussis*, sensing of general changes in local conditions, such as nutrient depletion and secretion of inhibitory molecules by *B. pertussis*, can lead to growth rate adjustment (Nakamura et al. 2006) and differences in virulence factor secretion (Hozbor et al. 1993; Bogdan et al. 2001; Westdijk et al. 1997). Therefore, the growth phase and inoculum size are important parameters to take into account for the evaluation of growth inhibiting compounds. As the two different strains were also found to exhibit different sensitivities to various sources of complement and to heat inactivated and non-heat-inactivated immune serum, the standardized BGIA can also conveniently be used to measure sensitivity of various clinical isolates.

We also used the BGIA to measure sensitivity/resistance of *B. pertussis* to antibiotics. While antibiotic-resistant *B. pertussis* strains were rare in the past, resistance to the drugs routinely used to treat pertussis has emerged in recent decades. The first erythromycin-resistant strains were isolated in the USA (Korgenski and Daly 1997; Lewis et al. 1995) in the 1990s and outbreaks of macrolide-resistant strains were reported with increased frequency in China (Liu et al. 2017; Wang et al. 2014; Yang et al. 2015) and to a lower extent in Iran (Shahcheraghi et al. 2014) and France (Guillot et al. 2012). In these studies, antibiotic resistance had been assessed by agar-based enumeration methods (Hill et al. 2000), which could easily be replaced by the luminescence-based BGIA, allowing for the testing of sensitivity/resistance to several antibiotics simultaneously. BPSM is a streptomycin- and nalidixic acid-resistant strain. However, high concentrations of these antibiotics, above 25 µg/ml, inhibited *B. pertussis* growth, especially for nalidixic acid. At low concentrations, both antibiotics are known to be bacteriostatic, while they are bactericidal at high concentrations, even though their mechanism of action is different, as streptomycin binds to the 16S RNA and nalidixic acid inhibits the bacterial DNA gyrases and Topoisomerases IV (Correia et al. 2017). The resistance mechanism towards nalidixic acid has not been extensively studied in *B. pertussis* but according to the growth inhibition curve profile, a saturation point of the quinolone is reached earlier, above 25 µg/ml leading to high sensitivity ( $IC_{50}=31.36 \pm 4.23$ ), compared to streptomycin. As a cationic peptide that binds cell membrane to drill pores at the surface, polymyxin b is highly efficient against *B. pertussis* growth and no  $IC_{50}$  could be calculated, whereas chloramphenicol that inhibits protein synthesis by binding to the 23S RNA had an  $IC_{50}$  of  $0.22 \pm 0.022$ . Erythromycin, an antibiotic used against *B. pertussis*, is a macrolide, which is now often replaced by azithromycin, clarithromycin or trimethoprim-sulfamethoxazole due to emergence of erythromycin-resistance. The  $IC_{50}$  of BPSM towards erythromycin was found to be around 0.035 µg/ml as measured by the BGIA. The values obtained by the BGIA were in the same range as those determined by standard MIC assays and were also consistent with concentrations described in *B. pertussis* literature (Bannatyne and Cheung 1982; Field and Parker 1980). Thus, this BGIA can be used on clinical isolates to assess rapidly their antibiotic resistance in order to adapt antibiotic treatments and thus impede the spread of resistant strains.

*B. pertussis* has developed several complement evasion strategies to subvert host innate immunity (Thiriard et al. 2018), and complement sensitivity may vary among different clinical isolates (Brookes et al. 2018; Stefanelli et al. 2006) and to depend on the secretion of various virulence factors that can be modulated during growth (Barnes and Weiss 2002) and culture conditions (Luu et al. 2017). In this study, we show that the BGIA can be used to measure complement sensitivity and confirm that sensitivity differs between strains, bacterial growth medium and complement

source. As such, B1917 is more resistant to complement than BPSM, and for BPSM, but not for B1917, sensitivity to guinea pig complement was higher when the bacteria were grown in THJS medium compared to growth in SS medium. No difference between bacteria grown in SS or THJS media was seen when the sensitivity to human or mouse complement was tested. Thus, according to the source of complement used to assess complement-resistance, susceptibility may vary. Non-standardized assays to evaluate *B. pertussis* immune serum-sensitivity may explain some conflicting reports due to complement diversity and final concentrations used. Furthermore, serum resistance is *bvg*-regulated (Marr et al. 2007; Fernandez and Weiss 1998) and can be attributed to the *Bordetella* resistance killing antigen (BrkA) (Elder and Harvill 2004; Fernandez and Weiss 1994) and to the virulence associated gene 8 (Vag8) (Marr et al. 2011; Passerini De Rossi et al. 1999). BGIA could also be used to test different *B. pertussis* strains deficient in *bvg*-regulated-genes to decipher more precisely which virulence genes are associated to complement-resistance.

The BGIA also shows differences among strains and culture conditions with respect to sensitivity to immune serum, both heat-inactivated and non-heat-inactivated. BPSM was generally more sensitive than B1917 and bacteria grown in THJS medium were generally more sensitive to human immune serum than bacteria grown in SS. Interestingly, heat-inactivated serum inhibited only BPSM growth when the strain was cultured in THJS medium. The functional properties of growth inhibition serum are mediated by antibodies independently of complement. The correlates of vaccine- or infection-induced immunity to pertussis are still undefined, as, with the exception of pertussis toxin-neutralization assays, most studies focused on serum immunoglobulin levels rather than on functional studies of immune sera. In order to decipher immune correlates of protection against infection or disease the BGIA may thus be a useful tool to establish immunological signatures of protection via antibody functionality studies.

#### Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and in part by the PERISCOPE project, which has received funding for the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking under grant agreement No 115910. This Joint Undertaking receives support from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program, the European Federation of Pharmaceutical Industries and the Associations, and Bill & Melinda Gates Foundation. A.T. was supported by a fellowship for Inserm/Région Haut-de-France.

#### Acknowledgments

We gratefully acknowledge Andrew Gorrige and Breeze Cavell from the Public Health England for their advices and for providing us the human IgG- and IgM-depleted serum. We are also grateful to Luis Solans and Nathalie Mielcarek for their scientific suggestions.

#### Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### Author contributions

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: AT, DR and CL. Performed the experiments: AT. Contributed materials/analysis tools: AT, DR and CL. Performed data analysis: AT, DR and CL. Wrote the paper: AT, DR and CL.

In review

## Bibliography

- Bannatyne, R. M., and R. Cheung. 1982. "Antimicrobial Susceptibility of Bordetella Pertussis Strains Isolated from 1960 to 1981." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 21 (4): 666–67. <https://doi.org/10.1128/AAC.21.4.666>.
- Barnes, MG, and A Weiss. 2002. "Growth Phase Influences Complement Resistance of Bordetella Pertussis Growth Phase Influences Complement Resistance of Bordetella Pertussis" 70 (1): 403–6. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.403>.
- Bart, M J., M Van Gent, H G J Van der Heide, J Boekhorst, P Hermans, J Parkhill, and F R. Mooi. 2010. "Comparative Genomics of Pre vaccination and Modern Bordetella Pertussis Strains." *BMC Genomics* 11 (1): 627. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-627>.
- Bart, M J., S R. Harris, A Advani, Y Arakawa, D Bottero, V Bouchez, P K. Cassidy, et al. 2014. "Global Population Structure and Evolution of Bordetella Pertussis and Their Relationship with Vaccination." *MBio* 5 (2): 1–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.0107414>.
- Bogdan, J. A., J. Nazario-Larrieu, J. Sarwar, P. Alexander, and M. S. Blake. 2001. "Bordetella Pertussis Autoregulates Pertussis Toxin Production through the Metabolism of Cysteine." *Infection and Immunity* 69 (11): 6823–30. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6823-6830.2001>.
- Brookes, C, I Freire-Martin, B Cavell, F Alexander, S Taylor, R Persaud, N Fry, A Preston, D Diavatopoulos, and A Gorrige. 2018. "Bordetella Pertussis Isolates Vary in Their Interactions with Human Complement Components Article." *Emerging Microbes and Infections* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0084-3>.
- Correia, Susana, Patrícia Poeta, Michel Hébraud, José Luis Capelo, and Gilberto Igrejas. 2017. "Mechanisms of Quinolone Action and Resistance: Where Do We Stand?" *Journal of Medical Microbiology* 66 (5): 551–59. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>.
- Elder, K D., and E T. Harvill. 2004. "Strain-Dependent Role of BrkA during Bordetella Pertussis Infection of the Murine Respiratory Tract." *Infection and Immunity* 72 (10): 5919–24. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5919-5924.2004>.
- Feldstein, L R., S Mariat, M Gacic-Dobo, M S. Diallo, L M. Conklin, and A S. Wallace. 2017. "Global Routine Vaccination Coverage, 2016." *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 66 (45): 1252–55. <https://doi.org/10.1515/aot-2017-0039>.

- Fernandez, R. C., and A. A. Weiss. 1994. "Cloning and Sequencing of a Bordetella Pertussis Serum Resistance Locus." *Infection and Immunity* 62 (11): 4727–38.
- Fernandez, RC, and A A. Weiss. 1998. "Serum Resistance in Bvg -Regulated Mutants of Bordetella Pertussis." *FEMS Microbiology Letters* 163 (1): 57–63. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00127-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00127-X).
- Field, L. H., and C. D. Parker. 1980. "Antibiotic Susceptibility Testing of Bordetella Pertussis." *American Journal of Clinical Pathology* 74 (3): 312–16. <https://doi.org/10.1093/ajcp/74.3.312>.
- Guillot, Sophie, Ghislaine Descours, Yves Gillet, Jérôme Etienne, Daniel Floret, and Nicole Guiso. 2012. "Macrolide-Resistant Bordetella Pertussis Infection in Newborn Girl, France." *Emerging Infectious Diseases* 18 (6): 966–68. <https://doi.org/10.3201/eid1806.120091>.
- Hewlett, E L., D L. Burns, P A. Cotter, E T. Harvill, T J. Merkel, C P. Quinn, and E. S. Ribitz. 2014. "Pertussis Pathogenesis - What We Know and What We Don't Know." *Journal of Infectious Diseases* 209 (7): 982–85. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit639>.
- Hewlett, E L., and K M. Edwards. 2005. "Pertussis — Not Just for Kids." *New England Journal of Medicine* 352 (12): 1215–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp041025>.
- Hill, Bertha C., Carolyn N. Baker, and Fred C. Tenover. 2000. "A Simplified Method for Testing Bordetella Pertussis for Resistance to Erythromycin and Other Antimicrobial Agents." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3): 1151–55.
- Hozbor, D., M. E. Rodriguez, A. Samo, A. Lagares, and O. Yantorno. 1993. "Release of Lipopolysaccharide during Bordetella Pertussis Growth." *Research in Microbiology* 144 (3): 201–9. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(93\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90045-4).
- Korgenski, E. K., and J. A. Daly. 1997. "Surveillance and Detection of Erythromycin Resistance in Bordetella Pertussis Isolates Recovered from a Pediatric Population in the Intermountain West Region of the United States." *Journal of Clinical Microbiology* 35 (11): 2989–91.
- Lewis, Karen, Michael A. Saubolle, Fred C. Tenover, Mark F. Rudinsky, Stephen D. Barbour, and James D. Cherry. 1995. "Pertussis Caused by an Erythromycin-Resistant Strain of Bordetella Pertussis." *Pediatric Infectious Disease Journal*. <https://doi.org/10.1097/00006454-199505000-00010>.

- Liu, X, Z Wang, J Zhang, F Li, Y Luan, H Li, Y Li, and Q He. 2017. "Pertussis Outbreak in a Primary School in China." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 37 (6): 1. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001814>.
- Locht, C. 2018. "Will We Have New Pertussis Vaccines?" *Vaccine* 36 (36): 5460–69. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.055>.
- Luu, L D W, S Octavia, L Zhong, M Raftery, V Sintchenko, and R Lan. 2017. "Characterisation of the Bordetella Pertussis Secretome under Different Media." *Journal of Proteomics* 158: 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.02.010>.
- Marr, N, R Luu, and R C Fernandez. 2007. "Bordetella Pertussis Binds Human C1 Esterase Inhibitor during the Virulent Phase, to Evade Complement-Mediated Killing." *The Journal of Infectious Disease* 195 (4): 585–88. <https://doi.org/10.1086/516913>
- Marr, N, N R. Shah, Lee E J. Kim, and R C. Fernandez. 2011. "Bordetella Pertussis Auto-transporter Ag8 Binds Human C1 Esterase Inhibitor and Confers Serum Resistance." *PLoS ONE* 6 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020585>.
- Menozzi, F. D., R. Mutombo, G. Renauld, C. Gantiez, J. H. Hannah, E. Leininger, M. J. Brennan, and C. Le Locht. 1994. "Heparin-Inhibitable Lectin Activity of the Filamentous Hemagglutinin Adhesin of Bordetella Pertussis." *Infection and Immunity* 62 (3): 769–78.
- Mooi, F R, N A T Van Der Maas, and H E Melker. 2014. "Pertussis Resurgence: Waning Immunity and Pathogen Adaptation – Two Sides of the Same Coin," 685–94. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000071>.
- Nakamura, M M., S Y Liew, C A. Cummings, M M. Brinig, C Dieterich, and D A. Relman. 2006. "Growth Phase- and Nutrient Limitation-Associated Transcript Abundance Regulation in Bordetella Pertussis." *Infection and Immunity* 74 (10): 5537–48. <https://doi.org/10.1128/IAI.00781-06>.
- Passerini De Rossi, B N., L E. Friedman, F. Luis González Flecha, P R. Castello, M A. Franco, and J P F.C. Rossi. 1999. "Identification of Bordetella Pertussis Virulence Associated Outer Membrane Proteins." *FEMS Microbiology Letters* 172 (1): 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00009-9).
- Shahcheraghi, F, M N Lotfi, V S Nikbin, F Shooraj, R Azizian, M Parzadeh, M R A Torkaman, and S M Zahraei. 2014. "The First Macrolide-Resistant Bordetella Pertussis Strains Isolated from Iranian Patients." *Jundishapur Journal of Microbiology* 7 (6): 1–5. <https://doi.org/10.5812/jjm.10880>.

- Stainer, D. W., and M. J. Scholte. 1971. "A Simple Chemically Defined Medium for the Production of Phase I Bordetella Pertussis." *Journal of General Microbiology* 63 (2): 211–20. <https://doi.org/10.1099/00221287-63-2-211>.
- Stefanelli, P, M Sanguinetti, C Fazio, B Posteraro, G Fadda, and P Mastrantonio. 2006. "Differential In Vitro Expression of the BrkA Gene in Bordetella Pertussis and Bordetella Parapertussis Clinical Isolates." *Journal of Clinical Microbiology* 44 (9): 3397–3400. <https://doi.org/10.1128/JCM.00247-06>.
- Thalen, M, J Van Den Ijssel, Wi Jiskoot, B Zomer, P Roholl, C De Gooijer, C Beuvery, and J Tramper. 1999. "Rational Medium Design for Bordetella Pertussis: Basic Metabolism." *Journal of Biotechnology* 75 (2–3): 147–59. [https://doi.org/10.1016/S01681656\(99\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S01681656(99)00155-8).
- Thiriard, A, D Raze, and C Locht. 2018. "Diversion of Complement-Mediated Killing by Bordetella." *Microbes and Infection* 20 (9–10): 512–20. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.02.002>.
- Wang, Z., Z. Cui, Y. Li, T. Hou, X. Liu, Y. Xi, Y. Liu, H. Li, and Q. He. 2014. "High Prevalence of Erythromycin-Resistant Bordetella Pertussis in Xi'an, China." *Clinical Microbiology and Infection* 20 (11): 0825–30. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12671>.
- Westdijk, Janny, Jan Van den Ijssel, Marcel Thalen, Coen Beuvery, and Wim Jiskoot. 1997. "Quantification of Cell-Associated and Free Antigens in Bordetella Pertussis Suspensions by Antigen Binding ELISA." *Journal of Immunoassay* 18 (3): 267–84. <https://doi.org/10.1080/01971529708005819>.
- Yang, Ying, Kaihu Yao, Xiang Ma, Wei Shi, Lin Yuan, and Yonghong Yang. 2015. "Variation in Bordetella Pertussis Susceptibility to Erythromycin and Virulence-Related Genotype Changes in China (1970-2014)." *PLoS ONE* 10 (9): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138941>.
- Yeung, K H T, P Duclos, E. A S. Nelson, and R C W. Hutubessy. 2017. "An Update of the Global Burden of Pertussis in Children Younger than 5 Years: A Modelling Study." *The Lancet Infectious Diseases* 17 (9): 974–80. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30390](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30390)
- Zhang JH, TDY Chung and KR Oldenburg. 1999. "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." *Journal of Biomolecular Screening* 4 (2) : 67-73.

## Legends to figures

**Figure 1: RLU-CFU correlation and optimization of inoculum and culturing time.** (A) Different bacterial concentrations, ranging from  $10^1$  to  $10^7$  CFU/well were measured by luminescence (RLU) and by CFU counting. The linear regression ( $r^2=0.9345$ ,  $p < 0.0001$ ,  $CFU=1.37 (+/-0.05)*RLU - 0.88 (+/0.19)$ ) represented by the full line and its deviation indicated by the dotted lines correspond to three independent experiments done for each bacterial concentration in triplicate. (B) The bacterial growth kinetic was evaluated by reading luminescence after 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20- and 24-hours incubation of different concentrations of bacteria, ranging from  $10^3$  to  $10^7$  CFU/well, represented respectively by circles, squares, triangles, reversed triangles and diamonds. Each symbol represents the mean of three independent experiments each done in duplicates. Luminescence read for each time point and for each bacterial concentration was normalized to its corresponding luminescence at time 0.

**Figure 2: Dose-response curves to antibiotics and corresponding IC<sub>50</sub>.** Indicated antibiotics at indicated concentrations were tested for growth inhibition on BPSM. After 16 hours of incubation, RLU values are reported in percentages of growth relative to bacterial growth in the absence of antibiotics. The dose-response curves to streptomycin (A), nalidixic acid (B), polymyxin b (C), chloramphenicol (D), erythromycin (E) and gentamicin (F) are represented as means of three independent experiments. The IC<sub>50</sub> value of each antibiotic is indicated in the corresponding graph.

**Table 1:** BGIA assay's IC<sub>50</sub> with standard deviation and MIC from standard assay expressed in  $\mu\text{g/ml}$ .

**Figure 3: BGIA kinetics using human anti-pertussis serum.**  $10^4$  CFU/well of BPSM was incubated with two-fold serial dilutions, ranging 1/2 to 1/2048, of the standard pertussis immune serum NIBSC (06/140). After 2, 4, 8, 12 or 16h of incubation luminescence was read and normalized for each time point to control bacteria grown without anti-serum. The data are expressed as means of three independent experiments. The non-linear regression curve is represented by the line following a four parameters logistic analysis and the calculated ID<sub>50</sub> are depicted by the dotted lines with corresponding values for each incubation time that are 30,96 +/- 0,07, 49,06 +/- 0,03, 67,06 +/-0,04, 106,6 +/- 0,01 and 87,70 +/- 0,03 after 2h, 4h, 8h, 12h and 16h, respectively.

**Figure 4: Sensitivity of different *B. pertussis* strains grown in different media to different sources of complement.** BPSM (circles) and B1917 (squares) grown in SS (black) or THijs (white) medium were incubated with different concentrations ranging from 1% to 15% of IgG- and IgM-depleted human serum (A), guinea pig serum (B) or baby rabbit complement (C). Luminescence was read after 4 hours of incubation and normalized to that of bacteria grown without complement. The results are shown as the means and standard deviations from three independent experiments analyzed by a two-tailed 1-way ANOVA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ .

**Figure 5: Dose-dependent *B. pertussis* growth inhibition by non-heat-inactivated and heat-inactivated human anti-pertussis serum.** BPSM (circles) and B1917 (squares), grown in SS (black) or THijs (white) medium were incubated for 4 hours with two-fold serial dilutions, ranging from 1/2 to 1/4096, with (A) NIBSC (06/140) serum or (B) heat-inactivated NIBSC (06/140) serum. The luminescence reads were normalized to bacteria grown without antiserum. (C) Areas under the curve (AUC) were calculated using the data depicted in figure 5A and B for BPSM grown in SS medium (black bars) or in THijs medium (white bars) and B1917 grown in SS medium (grey hatched black filled bars) or THijs medium (grey hatched white filled bars). Statistical analyses were performed with a two-tailed, Student's t-test on three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ .

Figure 1

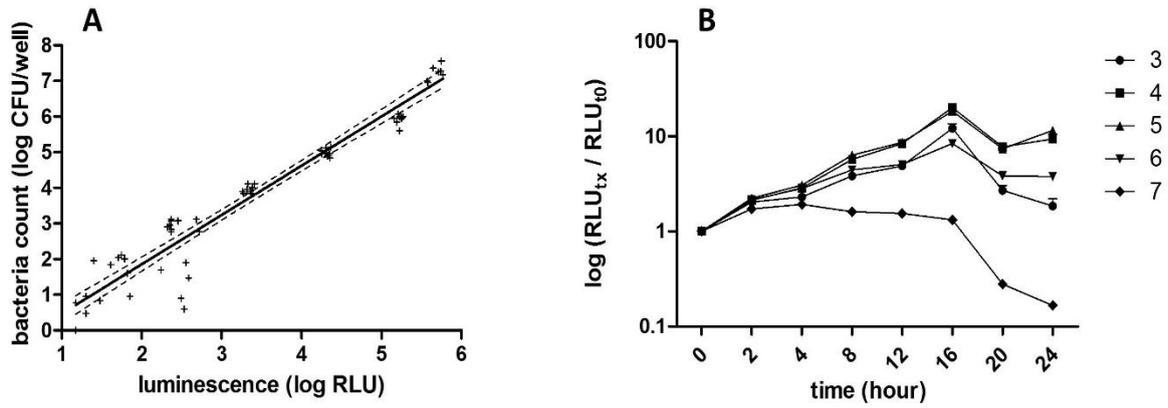


Figure 2

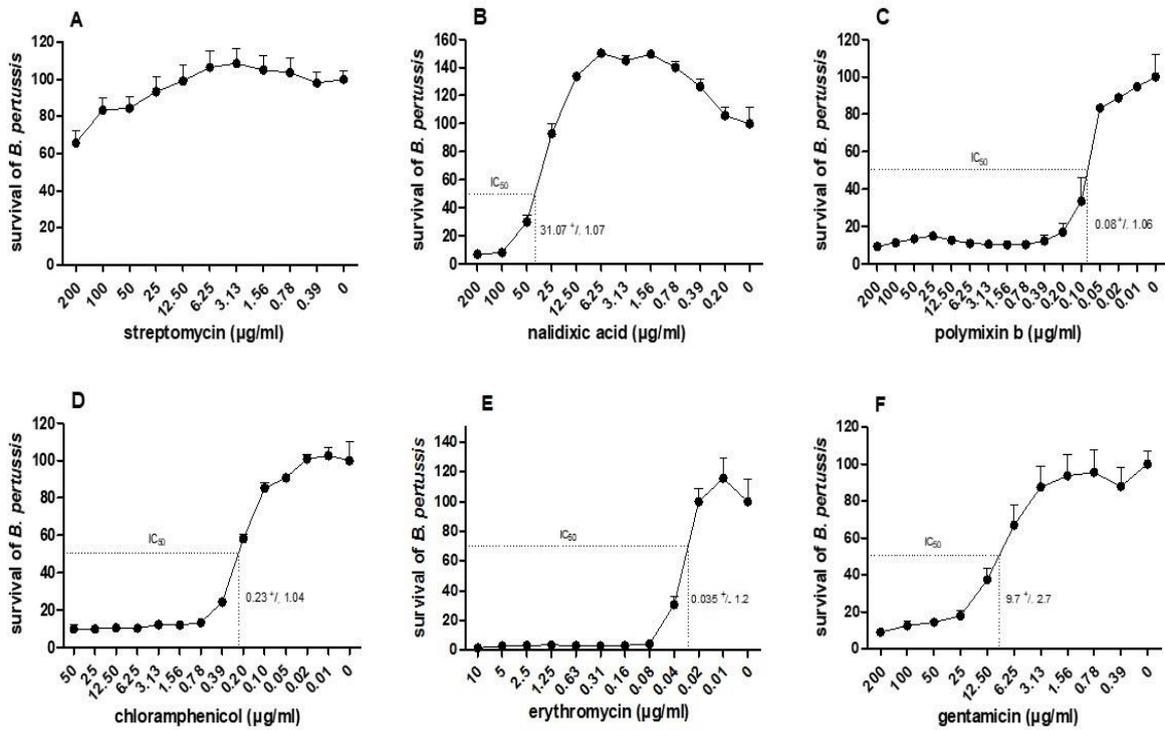


Figure 3

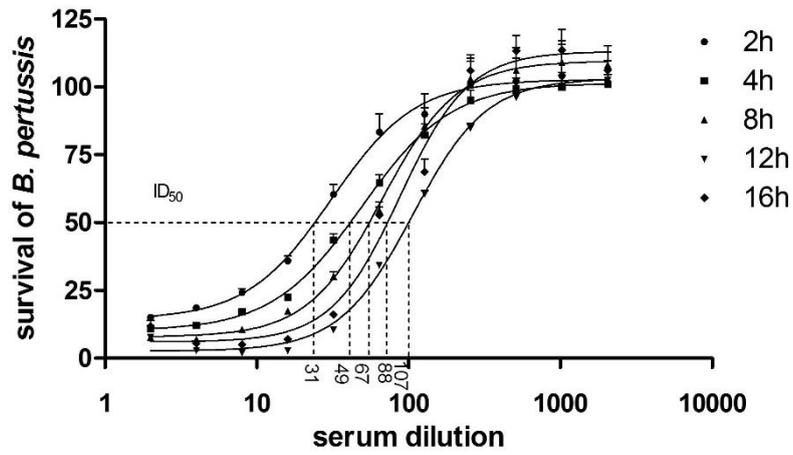


Figure 4

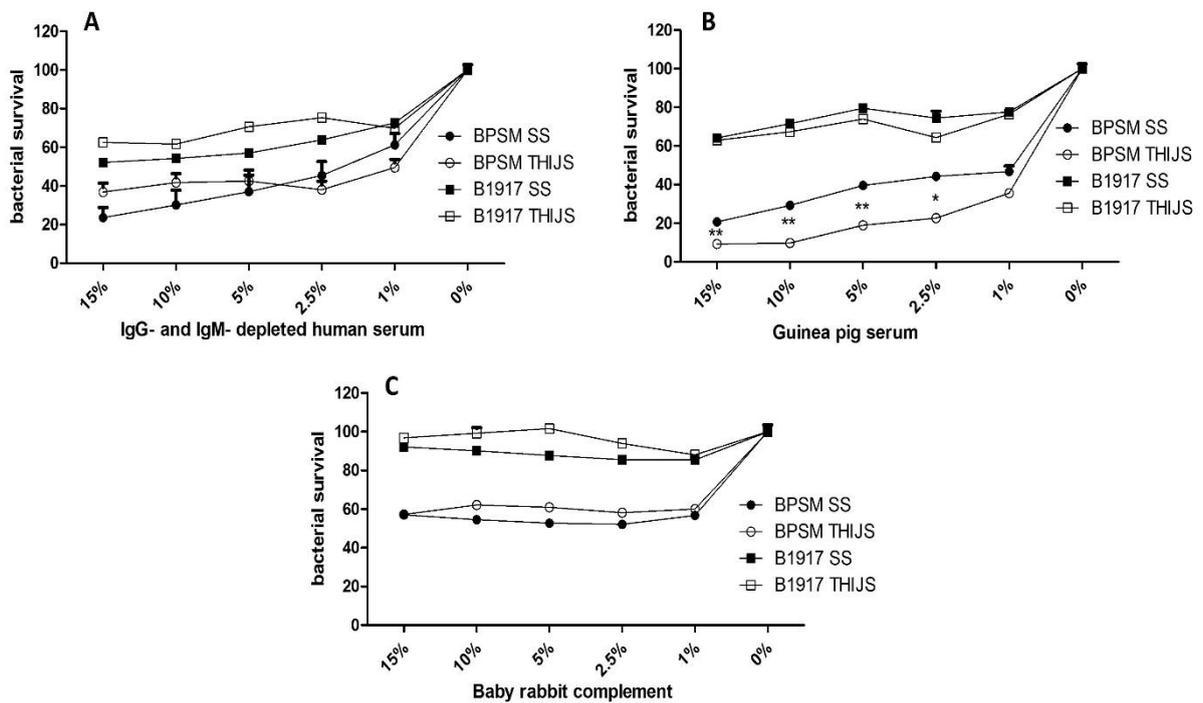
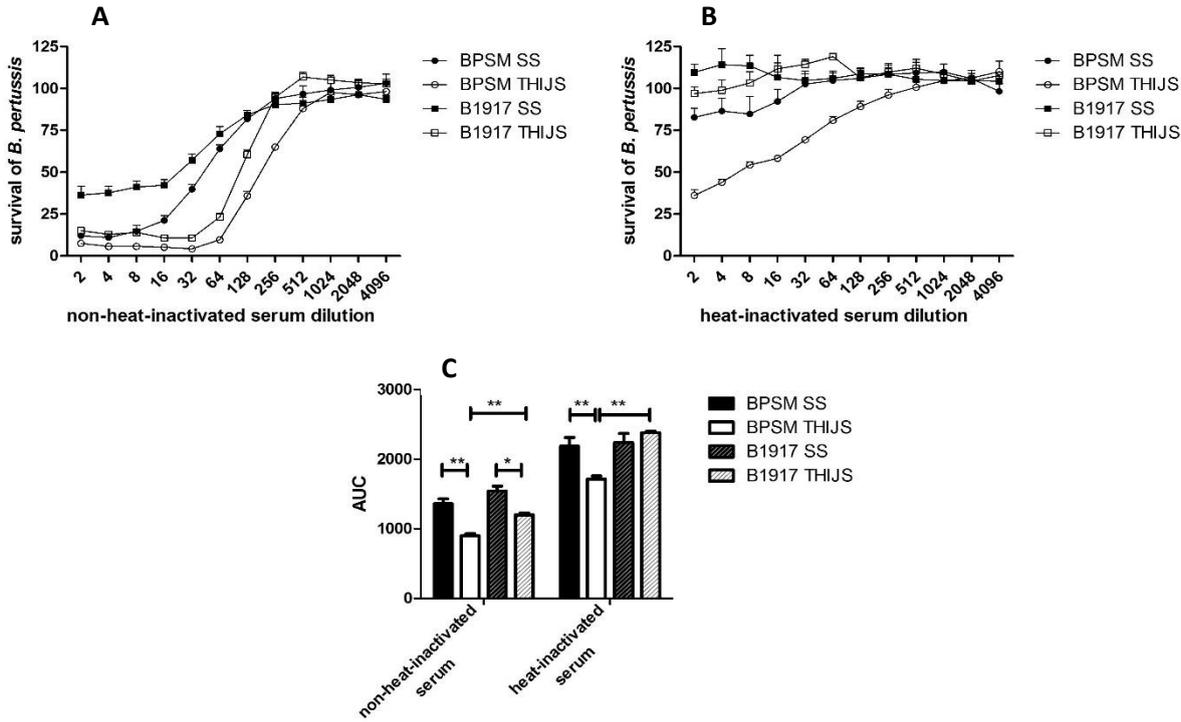


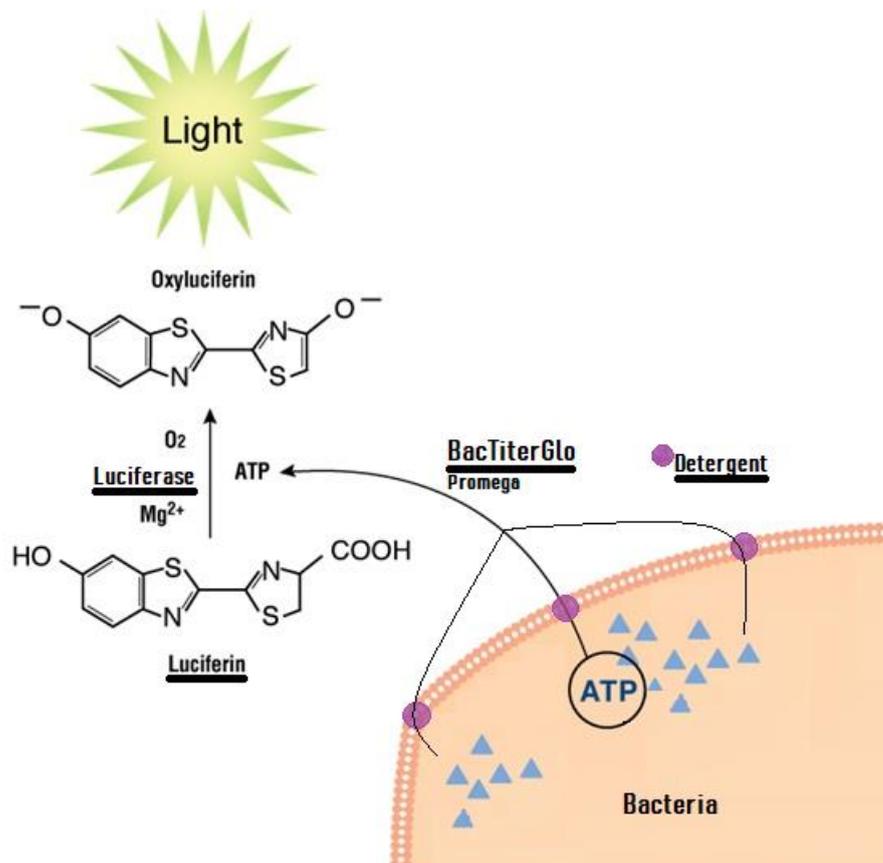
Figure 5



## B. Résumé de publication

L'article de *Frontiers in Microbiology* introduit le test BGIA « *Bordetella* Growth Inhibition Assay » comme test d'inhibition de croissance de *Bordetella* mis au point et développé pendant la thèse. Il a été conçu pour répondre à plusieurs critères, 1) être utilisable à haut-débit, 2) être applicable sur différentes souches et isolats cliniques de *B. pertussis*, 3) être peu consommateur de réactif, 4) être reproductible et 5) être rapide et simple d'utilisation.

Ce test *in vitro* d'inhibition de croissance de bactéries consiste à incuber des bactéries en microplaques avec des éléments inhibiteurs de croissance comme des antibiotiques (bactériostatiques ou bactéricides) ou des séras (provenant d'humains, de babouins, de souris qu'ils soient naïfs, vaccinés, immunisés ou infectés). Après incubation avec une gamme de dilution de l'échantillon à tester, un réactif produisant une luminescence proportionnelle au nombre de bactéries vivantes, est ajouté pour établir un taux de survie bactérienne.



**Figure 20:** Mécanisme d'émission de luminescence. Les bactéries métaboliquement actives libèrent dans le milieu de l'ATP intracellulaire suite à l'ajout du réactif BacTiter-Glo (Promega) qui contient un détergent. Le réactif contient également de la luciférine et de la luciférase, enzyme qui va oxyder la luciférine en oxyluciférine en émettant des photons. Cette enzyme est dépendante d'ATP, de magnésium et d'oxygène. L'émission de photons est proportionnelle à la concentration d'ATP libérée donc dépend du nombre de bactéries viables

L'application à haut-débit permet d'utiliser ce test dans le cadre d'étude de larges cohortes pour évaluer, par exemple, l'effet d'un vaccin sur la protection induite médiée par anticorps ou sur la protection médiée lors d'une infection naturelle à la coqueluche. En effet, l'évaluation de l'activité effectrice des anticorps est difficilement opérable sur de nombreux échantillons en raison des protocoles fastidieux de dilutions en série d'échantillons bactériens à étaler sur milieu solide pour le comptage de colonies (« colony-forming units », CFU) et de mise en culture des cellules eucaryotes pour les tests de neutralisation de toxines et d'adhésines, d'agglutination ou de précipitation et d'opsonophagocytose. Pour ce faire, le BGIA est basé sur une méthode de luminescence comme mesure de survie bactérienne au lieu de la méthode classique de CFU. La luminescence produite réside en l'ajout d'un réactif commercial BacTiter-Glo (Promega) qui contient de la luciférine, de la luciférase et un détergent. Le détergent s'insère dans la membrane des bactéries, formant des pores, induire une lyse et permet de relarguer dans le milieu de l'ATP bactérien intracellulaire, marqueur d'activité métabolique. La réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine via l'activité enzymatique de la luciférase ne peut se faire qu'en présence d'oxygène et d'ATP (**Fig.20**). Cette réaction libère des photons en un signal luminescent stable et intense, et est mesurée par un luminomètre à la longueur d'onde de 560nm. Le signal de luminescence, exprimé en unité relative de luminescence (RLU), est donc proportionnel à la quantité d'ATP et donc, par extension, est proportionnel au nombre de bactéries métaboliquement actives.

Comme la luminescence est amenée par une source extérieure, le BGIA peut s'appliquer sur n'importe quelle souche et isolat clinique sans avoir recours à une modification génétique ou à un marquage de surface comme cela a été fait auparavant par l'utilisation de la fluorescence<sup>247,248</sup>. De plus, la luminescence est une méthode de mesure finale qui ne nécessite pas plusieurs jours d'incubation pour estimer la survie bactérienne.

Le test s'effectue en plaque blanche pour maximiser la réflexion des photons, dans un format 96 demi-puits pour diminuer les interférences de signal entre les puits voisins et à l'aide d'un luminomètre dont le capteur est situé au-dessus de la plaque, et non en dessous, afin d'améliorer le ratio signal-bruit. Différents luminomètres (PolarStar Omega de BMG Labtech, Saprk de Tecan, Centro LB 960 de Berthold, Tristar<sup>2</sup> LB 942 de Berthold, Centro XS<sup>3</sup> LB 960 de Berthold) et différents types de microplaques (Nunc, Corning, Greiner) ont été utilisés pour optimiser cette technique.

Par ailleurs, l'utilisation de microplaques permet également de réduire les volumes nécessaires au test, d'être plus reproductible grâce à une meilleure standardisation des conditions techniques et d'être aussi plus rapide. Effectivement, un puit de la microplaque contient 10 µl de bactéries et 10 µl d'échantillons dilués à tester pour 20 µl de réactif BacTiter-Glo. Ce faible volume a

été choisi en raison d'un taux d'évaporation réduit après incubation (-8% du volume final) mais surtout pour économiser les échantillons précieux comme les séra issus de nouveau-nés.

La reproductibilité du BGIA est basée particulièrement sur la standardisation des cultures bactériennes de *B. pertussis* en phase exponentielle de croissance. En bref, après une culture de 36h sur boîte BG, les bactéries sont récoltées à la suite d'une culture liquide de 16h, ajustées à la concentration de  $10^4$  CFU/puit pour effectuer le BGIA et stockées à  $-80^\circ\text{C}$  en aliquots pour une utilisation unique. La stabilité de chaque tube est testée à chaque plaque de BGIA par une lecture au début et à la fin de l'incubation sans agents inhibiteurs.

Dans cet article, nous avons montré une bonne corrélation entre la méthode BGIA, exprimée en RLU, et la méthode de référence de comptage de colonies sur boîte, exprimée en CFU, avec un  $r^2 > 0.93$  (Fig.1a). La corrélation est d'autant plus grande au-delà de  $10^3$  CFU/puit. Cependant, nous avons constaté que la croissance bactérienne, en absence d'inhibiteurs, dans ces conditions de culture particulière dépend de la concentration initiale utilisée. La cinétique de croissance (Fig.1b) montre une multiplication bactérienne d'un facteur 10 pour les concentrations de  $10^3$  à  $10^6$  CFU/puit en 16h d'incubation, puis une diminution reflétant le début de la phase stationnaire. Alors que la concentration  $10^7$  CFU/puit indique une multiplication maximale après 2h d'incubation puis un plateau jusqu'à 16h et un déclin ultérieur. Ces résultats suggèrent que le BGIA est robuste sur une gamme de concentration bactérienne de  $10^4$  à  $10^6$  CFU/puit.

Comme preuve de concept, nous avons étudié l'effet de différents antibiotiques, bactériostatiques et bactériolytiques, après 16h d'incubation avec une souche de laboratoire de *B. pertussis* et déterminer les concentrations inhibitrices médianes ( $IC_{50}$ ) (Fig.2). Les résultats obtenus en BGIA ont été mis en parallèle avec des résultats obtenus au laboratoire selon la technique de référence de concentration minimale inhibitrice (CMI) (Table1) et ont montré une similarité des concentrations inhibitrices calculées.

Ensuite, nous avons effectué une cinétique d'inhibition de croissance à l'aide d'un antisérum standard du NIBSC (06/140) dilué en série, dont la composition en IgG et IgA anti-PT, anti-FHA et anti-PRN est connue (Fig.3). On constate que l'activité inhibitrice du sérum est dose-dépendante et peut être observée à des temps d'incubation courts, 2 et 4h, reflétant une activité bactéricide, et à des temps plus tardifs, dès 8h jusqu'à 16h, indiquant une combinaison des effets statiques et lytiques du sérum sur la croissance bactérienne.

Plusieurs rapports de la littérature concernant la résistance au complément et l'étude des sérums bactéricides sur *B. pertussis* montrent des résultats variables d'un laboratoire à l'autre, probablement dues à l'utilisation de différents milieux, souches et sources de complément. C'est pourquoi, nous avons étudié en parallèle

l'influence du milieu de culture liquide des bactéries (SS ou THIS) sur l'expression du phénotype résistant ou sensible à différentes sources de complément (Fig.4) et au sérum anti-coqueluche standard (Fig.5), et la sensibilité d'une souche de laboratoire, BPSM, et d'un isolat clinique, B1917. On constate que BPSM est statistiquement plus sensible au complément que B1917 et qu'il n'y a pas de différence significative entre des bactéries cultivées dans du milieu SS ou du milieu THIS pour la sensibilité au complément humain ou de bébé lapin. Néanmoins, BPSM cultivée en THIS est plus sensible au complément de cochon d'inde que BPSM cultivée en SS (Fig.4b). Les 3 sources de complément utilisées offrent des profils de résistance différents. B1917 est plus sensible au complément humain qu'au complément de cochon d'inde et est presque insensible au complément de bébé lapin. BPSM est très sensible au complément de cochon d'inde comparé au complément humain et de bébé lapin. Nous avons également pu constater que la résistance au complément variait sensiblement entre les différents lots commerciaux. L'étude de l'antisérum standard avant décomplémentation (Fig.5a) a montré d'une part que BPSM et B1917 sont plus sensibles à l'activité de celui-ci une fois cultivées en THIS plutôt qu'en SS (Fig.5a) et d'autre part que B1917 cultivée en SS est plus résistante que BPSM dans les mêmes conditions (Fig.5c). Parallèlement, après décomplémentation (Fig.5b), seul BPSM apparaît sensible au sérum et d'autant plus lorsque les bactéries sont cultivées dans du THIS (Fig.5c).

Ce travail a permis de mettre en place un test capable d'évaluer les résistances aux antibiotiques et au complément, et de déterminer une fonction effectrice des anticorps présents dans le sérum, indépendamment de cellules immunitaires ou épithéliales. Cette activité inhibitrice de croissance, dépendante d'anticorps, peut-être médiée par le complément ou en être indépendante.

### **C. Résultats complémentaires – la recomplémentation**

Le test de référence *in vitro* qui permet de déterminer l'importance de l'activité CDC est le SBA<sup>249</sup>. Il consiste à incuber du sérum décomplémenté avec des bactéries en présence d'une concentration connue de complément rajouté. Ce protocole, appliqué au BGIA, n'ayant pas été publié dans la référence précédente est détaillé ci-dessous.

## 1. Matériel et méthodes

### *Culture bactérienne*

Cf la partie « Materials and Methods », sous-partie « Bacterial strains and culture conditions » dans la section V. A.

### *Source de sérum et de complément*

Cf la partie « Materials and Methods », sous-partie « Sera, complement sources and antibiotics » dans la section V. A.

### *BGIA*

10 µl de bactéries, BPSM ou B1917, à la concentration initiale de  $2.10^6$  CFU/ml ont été ajoutés dans chaque puit de la microplaque blanche 96 demi-puits (Greiner, 675075). Y a été ajouté soit 10 µl de l'antisérum standard (NIBSC, 06/140) non décomplémenté ou décomplémenté dans les puits tests, soit 10 µl de milieu SS ou THJS dans les puits contrôles t0 (avant l'incubation) et t4 (4h après l'incubation). La décomplémentation s'est faite à 56°C pendant 30 min. Différentes sources de complément ont été utilisées pour la recomplémentation du sérum et différentes concentrations ont été testées en BGIA. Des puits contrôles remplis de bactéries et de complément uniquement, ont servi à évaluer l'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. La plaque recouverte d'un couvercle en plastique (Greiner, 656190) a été centrifugée à 10 x g pendant 1 min puis incubée sans agitation à 37°C. Après 4h d'incubation, 20 µl de BacTiter-Glo (Promega, G8230) ont été ajoutés à chaque puits, puis incubés pendant 10 min à température ambiante sur un agitateur à plaques orbitales. Après cette incubation, le signal de luminescence a été lu avec un luminomètre (Berthold Centro XS<sup>3</sup> LB 960) avec les paramètres suivants : 5 min de délai par plaque dans le noir et un temps de comptage de 0,1 seconde par puit.

### *Suivi de croissance bactérienne continue*

Après 36h de culture sur boîte BG à 37°C, les bactéries ont été récoltées et ensemencées pour une culture liquide sans antibiotique en milieu SS ou en milieu THJS à une DO de 0.15. La mesure de densité optique a été réalisée en continu par l'intermédiaire du système Elocheck (Biotronix).

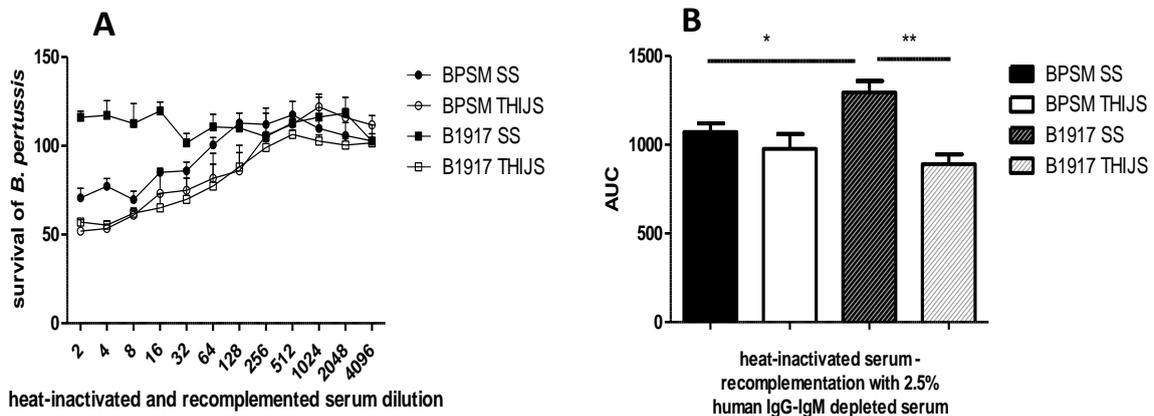
### *Analyse*

Cf la partie « Materials and Methods », sous-partie « Analyses » dans la section V. A.

## 2. Résultats

L'activité inhibitrice de croissance bactérienne dépendante de complément et médiée par anticorps a été évaluée dans cette partie.

Nous avons décidé d'étudier l'effet de la recombplémentation par rapport à l'activité du sérum non décomplémenté et décomplémenté afin de déterminer l'importance du complément dans l'activité bactéricide des anticorps anti-pertussis humain. Dans un souci de respecter l'homologie d'espèce concernant la composition des séra en protéines du complément et leur concentration, nous avons étudié l'effet du sérum humain déplété en IgG-IgM sur le sérum standard (NIBSC, 06/140). Ce dernier est un pool de séra provenant d'individus vaccinés et infectés à *B. pertussis*. Ce sérum est utilisé à la concentration finale de 2.5% en BGIA (**Fig.21**), en accord avec les données de la littérature<sup>234</sup>.

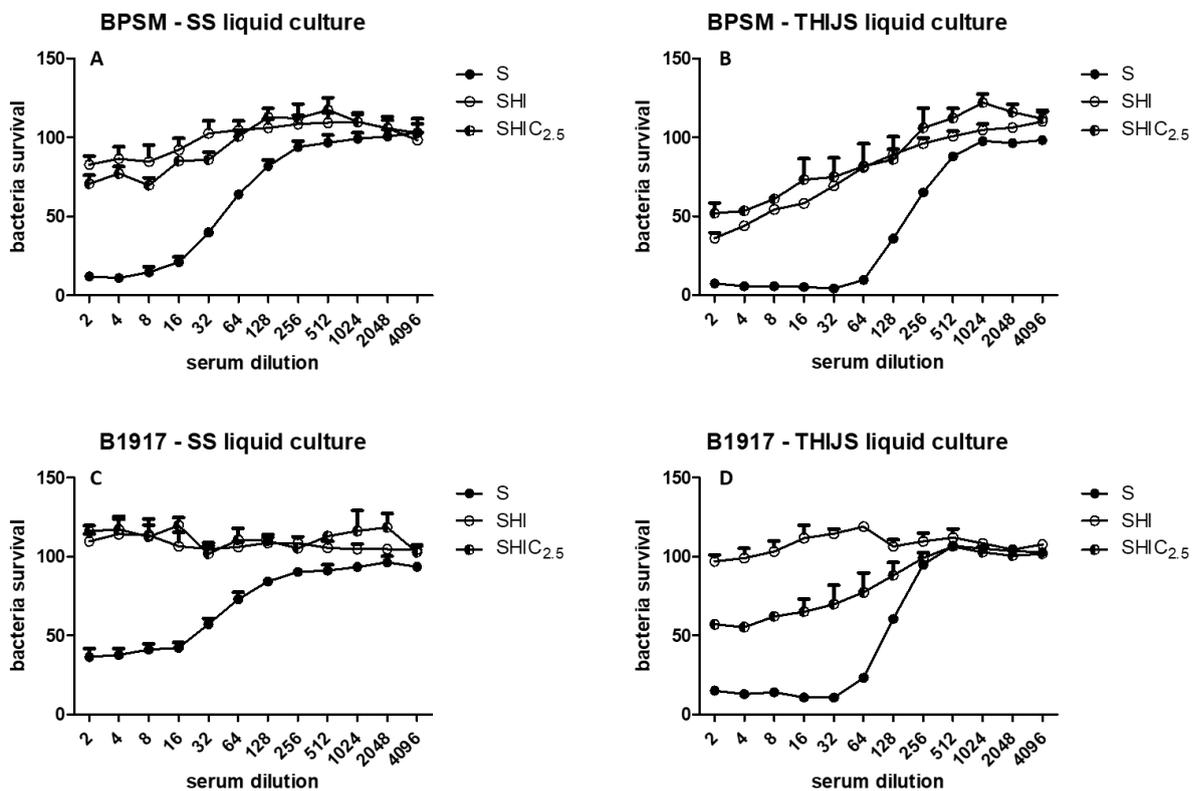


**Figure 21:** Activité inhibitrice de l'antisérum standard (NIBSC, 06/140) décomplémenté et recombplémenté avec 2.5% de sérum humain déplété en IgG-IgM mesuré en BGIA. (A) L'activité représente la survie bactérienne de la souche de laboratoire, BPSM (rond), et d'un isolat clinique, B1917 (carré), cultivée dans du SS (en noir) ou du THijs (en blanc), en fonction de la dilution du sérum standard décomplémenté puis recombplémenté. Les résultats de survie sont normalisés en pourcentages de survie par rapport à des contrôles mesurant l'activité du complément seul sur les bactéries. (B) Représentation des aires sous la courbe (AUC) issues de la figure (A) en fonction de la souche et du type de culture liquide associée. Les résultats représentent 3 expériences indépendantes réalisées en dupliqua. Le test statistique appliqué en figure (B) est un Mann-Whitney bilatéral avec \* $p < 0.1$  et \*\* $p < 0.01$ .

On constate que la recombplémentation du sérum standard (06/140, NIBSC) avec 2.5% de sérum humain déplété en IgG et IgM n'a pas d'impact sur l'effet inhibiteur des anticorps présent dans l'antisérum standard sur la croissance de la souche B1917, cultivée en SS (**Fig.21A**). En revanche, cet effet est observable jusqu'à la dilution de sérum au 1 : 256 pour les bactéries cultivées en THijs, et est comparable entre BPSM et B1917. Ces effets ont été quantifiés en mesurant les aires sous la courbe, noté AUC (**Fig.21B**). B1917 est significativement plus résistante

lorsqu'elle est cultivée en SS plutôt qu'en THJS. De plus, en milieu SS, B1917 est plus résistante à la reconstituration que BPSM. Aux concentrations de sérum les plus élevées, cet effet atteint presque 50% pour les 2 souches. A ces concentrations, BPSM cultivée en milieu SS est plus résistante que lorsqu'elle est cultivée en THJS avec environ 60% de survie. L'activité inhibitrice est perdue au-delà de la dilution de sérum 1 : 128. Cependant cette différence entre BPSM SS et THJS ne semble pas significative (**Fig.21B**).

Par ailleurs, les courbes de reconstituration à 2.5% se superposent avec les courbes de déreconstituration pour BPSM cultivée en SS (**Fig.22A**) et THJS (**Fig.22B**), et B1917 cultivée en SS (**Fig.22C**) mais pas en THJS (**Fig.22D**). De plus, les courbes de reconstituration ne se superposent pas avec la courbe d'activité du sérum non-déreconstitué (**Fig.22**).

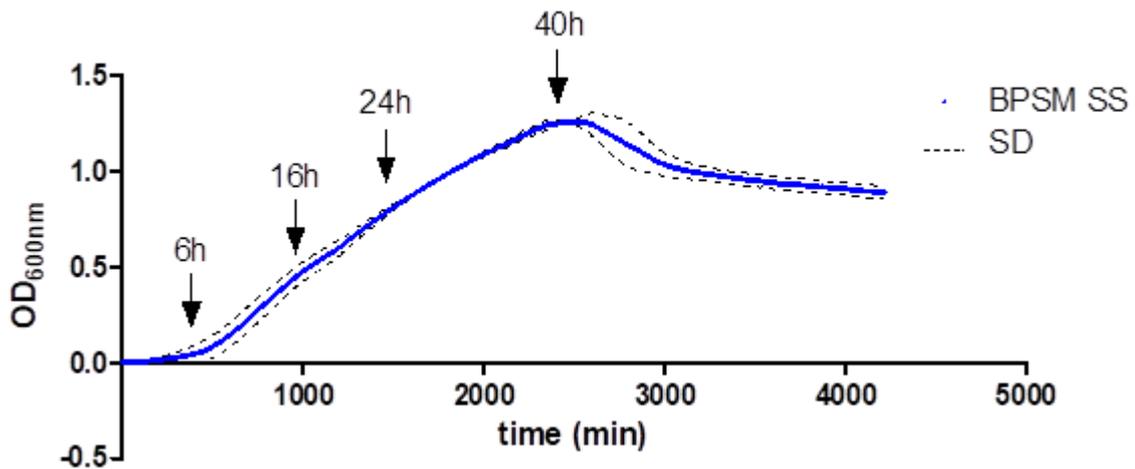


**Figure 22:** Courbes BGIA d'activité de l'antisérum standard (NIBSC, 06/140) sur la croissance de BPSM cultivée en SS (A), ou en THJS (B) et B1917 cultivée en SS (C) ou en THJS (D). Les 3 courbes d'inhibition de croissance en fonction du sérum, à savoir le sérum non-décomplémenté (noté S), décomplémenté (noté SHI) et reconstitué avec 2.5% de sérum humain déplété en IgG-IgM (noté SHIC<sub>2.5</sub>) sont représentées pour chaque condition de culture des *B. pertussis*. Ces graphiques regroupent les figures de la publication scientifique (courbes S et SHI) et la **figure 21A**.

Ces résultats montrent que la reconstituration de l'antisérum standard, avec 2.5% de sérum humain déplété en IgG-IgM, n'est pas suffisante pour obtenir l'inhibition de croissance observée avant la décomplémentation. Cela suggère donc que, soit la concentration finale en complément utilisée n'est pas suffisante, soit d'autres éléments du sang, aux propriétés inhibitrices, sont dénaturés lors du processus de décomplémentation par chaleur. Néanmoins, augmenter la concentration en complément risque d'augmenter la bactéricidie aspécifique, comme montré dans la figure 4A de la publication ci-dessus. A ce jour, il n'existe pas de protocole standard de SBA appliqué à l'étude des antisera contre *B. pertussis*. En effet, certaines études des antisera humains en SBA classique sont réalisées avec des gammes de concentration de complément issu de cochon d'inde allant de 1% jusqu'à 50%<sup>250-253</sup> ou issu de sérum humain déplété en IgG allant de 2.5% à 10%<sup>113,234,254</sup>. Cette disparité de protocole reflète probablement le manque de consensus concernant le rôle des anticorps bactéricides induits suite à une vaccination dans la protection contre la coqueluche.

Des études complémentaires montrant l'importance de la phase de croissance<sup>255</sup> et la carence en nutriment dans l'environnement de *B. pertussis* sur l'expression d'antigènes susceptibles d'expliquer la différence de sensibilité au complément ont permis de montrer que la disponibilité en glutamate jouait un rôle majeur dans le passage de la phase exponentielle vers la phase stationnaire de croissance<sup>256</sup>. De plus, ce passage dépend de l'activité du système à 2 composants Bvg et donc de l'expression des facteurs de virulence de la bactérie, incluant TcfA, PRN, Vag8 (...), potentiellement impliqués dans la résistance au sérum. Nous avons donc testé avec le BGIA la résistance au sérum de bactéries prélevées à différentes phases de croissance en milieu liquide SS.

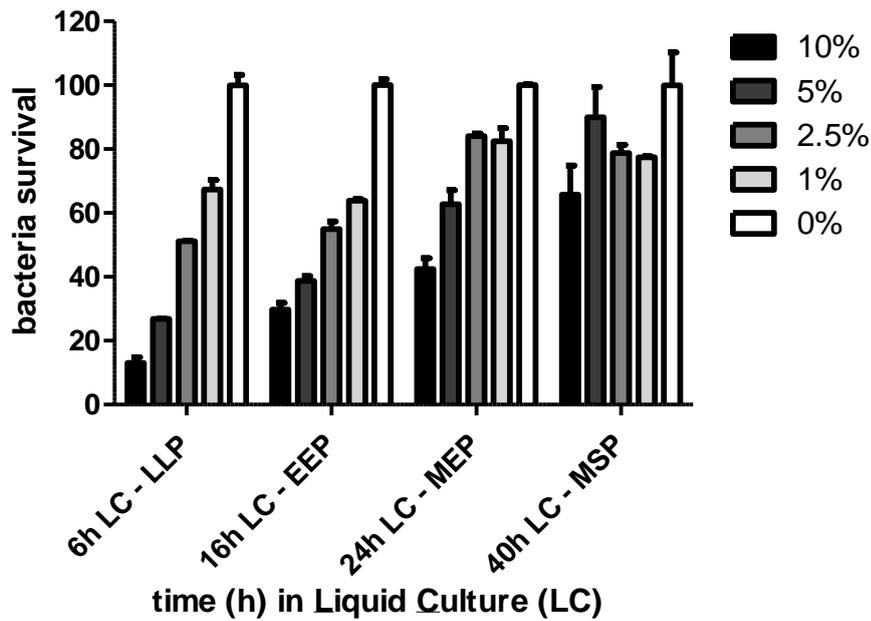
Pour sélectionner des points clés de croissance de la bactérie, nous avons d'abord réalisé un suivi de croissance de BPSM cultivée en milieu SS, par mesure de la densité optique en continu pendant 3 jours (**Fig.23**). D'après la courbe de croissance, la phase de latence dure près de 8h et correspond à un changement de métabolisme de la bactérie suite à une culture sur milieu solide, ensuite la phase exponentielle se situe entre 8h et 37h, puis la phase stationnaire entre 37h et 43h et enfin la phase de déclin au-delà de 43h de culture liquide. Des bactéries prélevées à la fin de la phase de latence, 6h, au début et au milieu de la phase exponentielle, 16h et 24h et pendant la phase stationnaire, 40h, sont conditionnées et utilisées en BGIA.



**Figure 23:** Courbe de croissance de BPSM en milieu liquide SS. La densité optique est mesurée à 600nm en continu pendant 3 jours (4320 heures). La courbe bleue représente la moyenne de 2 expériences indépendantes, et les lignes pointillées noires les limites supérieures et inférieures de l'écart-type à la moyenne. Les flèches symbolisent des points clés des phases de croissance de *B. pertussis* : 6h = fin de phase de latence, 16h = phase exponentielle, 24h= milieu de phase exponentielle et 40h= phase stationnaire.

La sensibilité au complément humain des bactéries prélevées selon les conditions précédentes a été évaluée en BGIA avec des concentrations croissantes de sérum humain déplété en IgG et IgM afin d'établir un lien entre phase de croissance bactérienne et résistance au complément (**Fig.24**). On constate qu'en fin de phase de latence, la moitié des bactéries étaient inhibées avec environ 2.5% de complément humain. En revanche, la concentration de complément à 50% inhibitrice en début de phase exponentielle se situe entre 2.5% et 5% alors qu'en fin de phase exponentielle elle est comprise entre 5% et 10%. Enfin, cette concentration n'a pas pu être déterminée lors de la phase stationnaire, indiquant une concentration supérieure à 10% pour induire une inhibition d'au moins 50% des bactéries.

Ces résultats indiquent que selon la phase de croissance de BPSM cultivée en milieu liquide SS, la résistance au complément diffère. Plus précisément, les bactéries deviennent résistantes au complément en phase stationnaire alors qu'au contraire elles y sont sensibles en début de phase exponentielle de croissance.



**Figure 24 :** Evaluation de la résistance au complément humain sur la survie bactérienne de BPSM en fonction de la phase de croissance des bactéries en BGIA. La mesure de BGIA a été réalisée après 4h d'incubation avec le complément. La source de complément utilisée était le sérum humain déplété en IgG et IgM à la concentration finale de 10%, 5%, 2.5% et 1%. Les bactéries ont été prélevées à différents temps de culture liquide dans du SS, 6h, 16h, 24h et 48h et correspondent respectivement à la fin de la phase de latence (LLP), au début de la phase exponentielle (EEP), au milieu de la phase exponentielle et en milieu de phase stationnaire (MSP), respectivement. LLP= late latency phase, EEP= early exponential phase, MEP= mid-exponential phase, MSP= mid-stationary phase. Le graphe représente les moyennes et les écart-standards de 2 expériences indépendantes.

#### D. Bilan sur le BGIA et l'activité *in vitro* du complément

Nous avons pu mettre en place un test d'inhibition de croissance, applicable à un criblage à haut-débit, spécifique à l'étude de séra immuns ou d'antibiotiques contre *B. pertussis*. Nous avons également constaté que selon la source de complément utilisée, le milieu de culture de la bactérie et sa phase de croissance avait une influence considérable sur sa résistance au sérum et au complément. Enfin, la souche circulante, isolée récemment (B1917), s'avère plus résistante au complément que la souche de laboratoire BPSM.

## **VI. Etude de la spécificité structurale et fonctionnelle d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes majeurs de *B. pertussis***

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont issus de la production d'un même plasmocyte et sont donc identiques entre eux. Ils ont été décrits dans la littérature de *B. pertussis* pour identifier les régions importantes responsables de l'activité fonctionnelle des antigènes. Par exemple, des études sur les mAbs anti-LOS ont permis de montrer que certains épitopes génèrent des anticorps bactéricides d'isotypes différents IgG1, IgG3 et IgM, alors que des anticorps IgG1 non-bactéricides reconnaissent un épitope différent<sup>257</sup>. Cependant, l'activité de ces anticorps *in vitro* n'a pas pu être corrélée avec la protection *in vivo*<sup>258</sup>. En parallèle, l'étude de mAbs dirigés contre le même épitope de la FHA a montré une différence d'inhibition d'adhérence sur cellules épithéliales *in vitro* sans différence d'activité agglutinante<sup>259</sup>. Afin de mieux caractériser les domaines fonctionnels des antigènes majeurs de *B. pertussis*, une étude approfondie sur l'isotype, les capacités de fixation et de reconnaissance de l'épitope de l'antigène, ainsi que les activités *in vitro* et *in vivo* est détaillée ci-dessous.

### **A. Matériel et méthodes**

#### *Culture des hybridomes - Production des mAbs*

9 lignées cellulaires d'hybridomes différentes produisant des IgG anti-FHA nous ont été généreusement cédées par H. Sato et Y. Sato. Les ampoules ont été stockées dans 95% de milieu de culture basique avec 5% de DMSO (Sigma) dans l'azote liquide. Elles ont été décongelées dans un bain marie à 37°C. Une fois décongelées, les cellules ont été reprises dans 10ml de milieu de culture basique : RPMI1640 GlutaMax (Gibco) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (Biowest) préalablement décomplémenté (56°C pendant 30min) et filtré à la concentration finale de 10%, puis ont été centrifugées 7 min à 300 x g à température ambiante. Le culot a été repris dans 6 ml de milieu complet : milieu basique supplémenté en insuline-transferrine-sélénium (Thermo) et 1 mM sodium pyruvate (Thermo) dans des flasques 25 cm<sup>2</sup> à bouchon ventilé (Sarstedt). Les flasques ont été incubées horizontalement dans un incubateur (Steri-Cycle i160, Thermo) à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Le suivi de la culture a été réalisé au microscope optique à contraste de phase, les cellules sont de formes rondes et en suspension. Tous les 2 à 3 jours, les cellules ont été centrifugées et le culot dilué au 1/3. D'abord le culot a été repris dans 20 ml de milieu complet dans des flasques 75 cm<sup>2</sup>, puis à 75% de confluence, les cellules ont

été rediluées dans 50 ml de milieu complet et incubées dans des flasques 175 cm<sup>2</sup>. A confluence, les cellules ont été centrifugées et le culot a été repris entièrement dans du RPMI1640 Glutamax uniquement pour permettre une bonne production des mAbs. Les cellules, disposées dans une flasque 175 cm<sup>2</sup>, ont été incubées pendant 4 à 5 jours. Le contenu de la flasque a été centrifugé à 10.000 x *g* pendant 10 min à 4°C, le surnageant a été filtré sur filtre 0.45 µm et conservé à -20°C avant purification.

#### *Purification et dosage des mAbs*

Une colonne 1 ml protéine G HiTrap (GE, Healthcare) a été connectée à une pompe dont le débit a été fixé à 1 ml/min et à un spectrophotomètre réglé à 280 nm. La colonne a été lavée avec 10 ml de tampon d'équilibration (20 mM de sodium phosphate, pH=7), puis le surnageant de culture, filtré et dilué au 1/3 dans ce tampon, a été passé sur la colonne. Une fois le surnageant passé, la colonne a été à nouveau lavée avec 10 ml de tampon d'équilibration. L'élution a été effectuée avec un tampon à 0.1 M de glycine (pH=2.7) dans des fractions récoltées de 1 ml et neutralisées avec 200 µl d'une solution de 1 M Tris-HCl (pH=9). Les fractions contenant les anticorps ont été identifiées par le suivi de l'absorbance et stockées à 4°C avant dosage. Les concentrations en IgG total des fractions d'élutions ont été déterminées par le NanoDrop 2000 (Thermo). Les fractions ont été conservées aliquotées à -20°C.

#### *Détection et identifications des mAbs*

Des gels SDS-polyacrylamide à 12% ont été préparés pour la séparation des chaînes légères et des chaînes lourdes des anticorps. Les fractions d'élution concentrées ont été dénaturées préalablement à 95°C pendant 10 min dans du tampon Laemmli. Les puits ont été chargés avec 2.5 µg/puit d'anticorps purifiés. L'électrophorèse a été effectuée à 150 V et 25 mA pendant 1h15 et le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Les anticorps produits par les différents hybridomes et purifiés ont été isotypés avec des bandelettes d'isotypage (IsoStrip, Roche).

#### *Expression des protéines hybrides*

Des fragments de la protéine FHA ont été insérés en fusion traductionnelle à l'extrémité C terminale d'une protéine porteuse, « maltose-binding protein » (MBP). Le protocole de constructions des pMAL2, pMAL83, pMAL85 a été publié<sup>260</sup> et les bactéries recombinantes produisant ces constructions ainsi que celle correspondant au pMAL84 étaient déjà présentes au laboratoire. Les amorces suivantes ont été conçues pour les constructions pMAL80, pMAL85-1, pMAL85-2, pMAL85-3, pMAL85-4 : (5'-tatagaattcggccgcatcggccttgatgtcca-3') et (5'-tataaagcttatccgccgcgacgtcgatcgaa-3'), (5'-tataggatcccctctacgccgagca-3') et (5'-tatactgcagctagatgcgcgccgcatccaggtgcat-3'), (5'-tataggatccaacaagctgggcccgcattcg-3') et (5'-tatactgcagctacaggctcaccggaagaggcg-3'), (5'-tataggatcccgcctctgctcaatgaagg-

3') et (5'-tataactgcagctaagtagcctcgccgtaagcctcca-3'), (5'-tataggatccgagtagcagaaggcgaagat-3') et (5'-tataaagcttctatgcctgcagccgcaccgcgtcga-3'), respectivement. Les fragments de PCR amplifiés et purifiés ont été intégrés par TA cloning (Thermo) dans le plasmide pCRII-TOPO et les constructions résultantes ont été transformées dans *E. coli* DH5 $\alpha$  chimiocompétente. La présence des inserts a été vérifiée par digestion enzymatique des plasmides issus de mini-préparations et l'intégrité de la séquence a été confirmée après un séquençage de Sanger. Les inserts ont ensuite été digérés par les couples d'enzymes EcoRI/HindIII pour la construction MAL80N, BamHI/PstI pour les constructions MAL85-1/2/3 et BamHI/HindIII pour la construction MAL85-4. Ensuite, les fragments purifiés ont été insérés dans le plasmide final pMALc2x (NEB) digéré avec les enzymes correspondantes et ces mélanges de ligation ont été introduits dans *E. coli* DH5 $\alpha$  chimiocompétente. La présence de l'insert a été à nouveau vérifiée par digestion enzymatique des plasmides issus de mini-préparations. Les clones positifs ont été conservés à -80°C avant la production des protéines hybrides.

#### *Production des protéines hybrides*

Les bactéries contenant les constructions codant les protéines hybrides ont été cultivées en milieu liquide à une DO initiale de 0.05. L'expression des protéines recombinantes a été induite à une DO d'environ 0.6 par l'ajout de 0.3 mM d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 3h à 37°C et sous agitation à 200 rpm. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 4.000 x *g* pendant 20 min à 4°C. Le culot a été resuspendu dans du tampon de lyse constitué de PBS, de DNase à 10  $\mu$ g/ml final et d'une pastille d'inhibiteurs de protéase (cOmplete, EDTA-free Roche) pour 50 ml de tampon. Le concentrat de bactéries a été lysé par 3 cycles de presse de French. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -20°C avant purification.

#### *Purification et dosage des protéines de fusion*

Un volume de 5 ml de résine d'amylose (NEB) a été tassé dans une colonne en verre reliée à une pompe dont le débit a été fixé à 2 ml/min. La résine a été nettoyée à l'eau, puis équilibrée avec 50 ml de tampon d'équilibration composé de 10 mM de tampon sodium phosphate (pH=7) et 500 mM de NaCl. Les culots lysés ont été dilués au 1/8 dans le tampon d'équilibration et passés sur la colonne. L'élution a été effectuée dans le tampon d'équilibration contenant 10 mM de maltose et suivie par un spectrophotomètre à 280 nm. Les protéines contenues dans les fractions d'élutions ont été ensuite quantifiées grâce au kit BCA (Thermo), aliquotées et stockées à -20°C.

#### *Précipitation de protéines*

Après 36h d'incubation sur boîtes BG à 37°C, les bactéries BPSM et BPGR4<sup>261</sup> ont été récoltées et mises en culture liquide dans du SS à une DO initiale de 0.2. La

culture a été incubée pendant 24h à 37°C sous agitation à 200 rpm, puis centrifugée pendant 20 min à  $V_{max}$  à 4°C. Le surnageant est conservé pour précipiter les protéines par la méthode TCA. Pour 40 ml de surnageant, 10 ml d'acide trichloroacétique à 30% et 1 ml de déoxycholate à 8 mg/ml ont été ajoutés. Après une incubation 30 min sur glace, la suspension a été centrifugée 15 min à 4°C à  $v_{max}$ . Le surnageant a été éliminé et le culot, contenant les protéines précipitées a été repris dans 4 ml 100 mM TRIS-HCl (pH=8), soit une concentration 10X.

#### *Détection et identification des protéines hybrides – Détermination de l'épitope*

Des gels SDS- polyacrylamide 12% ont été chargés avec 1 µg/puit de protéines hybrides purifiées et préalablement dénaturées avec du tampon Laemmli chauffé 10 min à 95°C. L'électrophorèse a été effectuée à 150 V et 25 mA pendant 1h. Le gel a été soit colorée en bleu de Coomassie pour vérifier les tailles de chaque construction, soit transféré sur une membrane de nitrocellulose 0.45 µm dans un tampon éthanol pendant 1h30 à 100 V et 350 mA. La membrane a été bloquée pendant toute une nuit à 4°C dans le tampon de blocage composé de PBS avec du Tween-20 à 0.1% et supplémenté en caséine à 5%. La membrane a été lavée 3 fois 5 min avec le tampon de lavage (PBS, 0.1% Tween-20), puis incubée avec soit un anticorps anti-MBP (NEB) dilué au 1/10.000 dans le tampon de lavage pour vérifier la présence du groupement MBP sur les protéines hybrides, soit les mAbs purifiés à la concentration finale de 1 µg/ml, dilués dans le tampon de blocage pendant 2h à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min avec le tampon de lavage, celle-ci a été incubée avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la HRP (Abcam), dilué au 1/8.000 dans le tampon de lavage pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min avec le tampon de lavage, celle-ci a été révélée avec le kit ECL Prime (GE Healthcare).

#### *ELISA – affinité des mAbs*

Dans des plaque à 96 puits (NUNC Maxisorp), 100µl de lysat total de BPSM et BPGR4 (une souche dérivée de BPSM délétée du gène de la FHA, *phaB*) à 1 µg/puit de protéines totales, ou 100µl de BPSM et BPGR4 inactivées<sup>262</sup> (56°C, 1h) à DO=0.1, ou 100 µl de FHA (Sanofi) à 1 µg/puit, ou les protéines codées par pMAL83 ou pMAL85 purifiés à 1 µg/ml, tous dilués dans du PBS, ont été déposés dans les puits de la plaque. Cette étape de fixation de l'antigène est réalisée à 4 °C sur la nuit. Ensuite les puits de la plaque ont été lavés 3 fois avec une solution de lavage constituée de PBS et de Tween-20 à la concentration finale de 0.1%. La plaque a été ensuite saturée en protéines aspécifiques avec la solution de lavage contenant de la caséine à la concentration finale de 2% pendant 2h à température ambiante. Puis, 100µl des mAbs à la concentration de 2 µg/ml et dilués dans du PBS ont été ajoutés dans les puits tests en suivant une gamme de dilution au ½, alors que du PBS seul a été ajouté aux puits contrôles. Cette incubation avec l'anticorps primaire a duré 2h à 37°C. Les puits ont été lavés 3 fois avec la solution de lavage avant d'ajouter un

anticorps anti-IgG de souris couplé à la HRP (Abcam) dilué 1/8.000. Enfin, les puits ont été lavés 5 fois avec la solution de lavage. La révélation a été faite par ajout de 100µl de TMB (Thermo) et la réaction a été stoppée avant saturation du signal avec 50 µl d'acide phosphorique 10 mM. La plaque a été lue avec le lecteur de plaque (ELx800, BioTek) à 450nm. Les titres ELISA ont été calculés selon la formule suivante :

$$x = \frac{(\log_{10}(3*\bar{x}_{DO(puits\ contr\^otes)})) - (ordonn\^ee\ \grave{a}\ origine(dilution^{-1}; \log_{10}(DO(puits\ tests))))}{pente(dilution^{-1}; \log_{10}(DO(puits\ tests)))}$$

Le calcul du coefficient de détermination  $r^2$  et la dispersion des mesures en nuage de point ont permis de vérifier la qualité de l'ELISA.

### *Résonance des plasmons de surface – affinité des mAbs*

Les tampons des réactifs ont été préalablement changés grâce à l'utilisation de colonnes de dessalage Zeba (Thermo), les mAbs purifiés dans le tampon de course HBS composé d'Hepes 10 mM (pH=7.4), 50 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween-20 et la FHA (Sanofi) dans un tampon acétate de sodium 10 mM (pH=5). Une lame de type CM5 (SensorChip, GE Healthcare) avec 2 paires de canaux (1 référence avec du tampon de course et 1 test avec le mAb dans le tampon de course) a été utilisée pour l'expérience ainsi qu'un Biacore 3000 (GE Healthcare). La lame a d'abord été équilibrée avec le tampon de course pendant 6 min à 10 µl/min, qui a été filtré sur membrane à 0.22 µm et dégazé. La phase d'immobilisation a été la suivante, la lame a été activée par un tampon EDC/NHS (0.4 M/ 0.1 M) pendant 7 min à un débit de 5 µl/min, puis le ligand FHA à 10 µg/ml a été fixé sur la lame pendant 5 min à un débit de 5 µl/min, et enfin la lame a été désactivée avec de l'éthanolamine à 1 M (pH=8.5) pendant 7 min à un débit de 5 µl/min. Les différents mAbs, ou analytes, ont été injectés à un débit de 20 µl/min pendant 2 min dans les canaux de la lame pour la phase d'interaction. Une gamme allant de 1 nM à 100 nM a été testée pour chaque mAb. La phase de régénération a été effectuée en injectant 10 µl en 30 sec de 10 mM de glycine-HCl (pH=2) et 0.7 M de NaCl, elle mesure la dissociation entre la FHA et les mAbs. Les sensorgrammes obtenues ont été exprimés en unité de résonance (RU) en fonction du temps montrant l'évolution de l'interaction entre le ligand et l'analyte et ont été analysés avec le logiciel BioEval. Les RU sont proportionnelles à la masse moléculaire de l'analyte fixé sur le ligand.

### *BGIA*

Dans une plaque à 96 demi-puits, 10 µl d'une culture de  $2.10^8$  CFU/ml de BPSM ont été déposées dans chaque puit. L'activité inhibitrice des anticorps, indépendante de complément, a été évaluée avec 10 µl d'anticorps purifiés à 1 µg/ml ou 10 µl de milieu SS. L'activité inhibitrice des anticorps, dépendante de complément, a été évaluée avec 5 µl de BRC de 1 à 5% et soit 5 µl d'anticorps purifiés à 1 µg/ml soit 5 µl de milieu SS. La plaque a été centrifugée à 10 x g pendant 1 min, puis incubée

sans agitation à 37°C. Après 16h d'incubation, 20 µl de BacTiter-Glo (Promega, G8230) ont été ajoutés à chaque puits, puis incubés pendant 10 min à température ambiante sur un agitateur à plaques orbitales. Après cette incubation, le signal de luminescence a été lu avec un luminomètre (Berthold Centro XS<sup>3</sup> LB 960) avec les paramètres suivants : 5 min de délai par plaque et un temps de comptage de 0,1 seconde par puit. Les résultats exprimés en RLU ont été normalisés en fonction des contrôles respectifs pour l'activité dépendante de complément, pourcentage de survie par rapport à l'activité du complément seul, ou indépendante de complément, pourcentage de survie maximal des bactéries.

#### *Culture de cellules épithéliales bronchiques – test anti-adhérence*

Les ampoules de cellules épithéliales alvéolaires A549 ont été stockées dans 95% de milieu de culture avec 5% de DMSO (Sigma) dans l'azote liquide. Elles ont été décongelées dans un bain marie à 37°C. Une fois décongelées, les cellules ont été reprises dans 10ml de milieu de culture basique : RPMI1640 GlutaMax (Gibco) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (Biowest) préalablement décomplémenté (56°C pendant 30min) et filtré à la concentration finale de 10%, puis centrifugées pendant 7 min à 300 x g à température ambiante. Le culot a été repris dans 6 ml de milieu dans des flasques 25 cm<sup>2</sup> à bouchon ventilé (Sarstedt). Les flasques ont été incubées horizontalement dans un incubateur (Steri-Cycle i160, Thermo) à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Le suivi de la culture a été réalisé au microscope optique à contraste de phase, les cellules sont de formes allongées et adhérentes. Tous les 2 à 3 jours, le surnageant a été changé. Avant confluence, le surnageant a été jeté, les cellules ont été lavées avec du PBS, puis décrochées avec de la trypsine-EDTA 0.25% (Gibco) après 5 min d'incubation à 37°C. Les cellules ont été dispersées et rincées avec un excès de milieu avant de les diluer au 1/4 pour faire des sous-cultures. En phase de croissance, 100 µl de 10<sup>4</sup> cellules A549 ont été déposées dans chaque puit d'une microplaque 96 puits (Greiner) noire à fond transparent et incubées 18h avant infection.

#### *Microscopie confocale*

La souche BPSM a été transformée au laboratoire avec le plasmide pBBPG codant la protéine fluorescente verte (GFP) (souche déjà construite au laboratoire mais non publiée). Après 36h sur boîte BG, les bactéries BPSM-GFP (ex/em : 488/510 nm) ont été récoltées et la concentration a été ajustée à 5.10<sup>6</sup> CFU/ml. Les cellules A549 (10<sup>4</sup> cellules/puit) ont été infectées avec 100 µl de bactéries fluorescentes de cette préparation (MOI=50) non traités ou préalablement pré-incubées pendant 30 min à 37°C avec des mAbs purifiés aux concentrations de 40 et 20 µg/ml. La plaque a été centrifugée à 640 x g pendant 5 min puis incubée 2h à 37°C. La plaque a ensuite été lavée 5 fois avec du PBS pour éliminer les bactéries non associées à la membrane. Un marqueur cytoplasmique Cell tracker CM dil (Thermo) (ex/em : 553/570 nm) a été incubé pendant 15 min à 37°C avec les cellules. Les puits de la

plaque ont ensuite été lavées 3 fois avant d'être incubées 10 min à température ambiante avec 4% de formaldéhyde. Après 3 lavages avec du PBS, la plaque a été incubée avec du DAPI (ex/em : 350/470 nm) pendant 5 min à température ambiante puis lavées encore 3 fois avant de recouvrir les puits avec 100 µl d'eau. La plaque a été conservée à l'obscurité à 4°C avant observation. Un microscope optique confocal (Zeiss LSM 880) associé au logiciel Zen2 a été utilisé. Les images ont été réalisées avec un objectif \*63 à huile et acquises avec 18 à 20 sections empilées de 0.56 µm d'intervalle. Les sections optiques ont été acquises à la taille de 1300\*1300 pixels. Les images ont été déconvoluées et mises en forme avec les logiciels ImageJ et Imaris.

### *Expérience de protection in vivo*

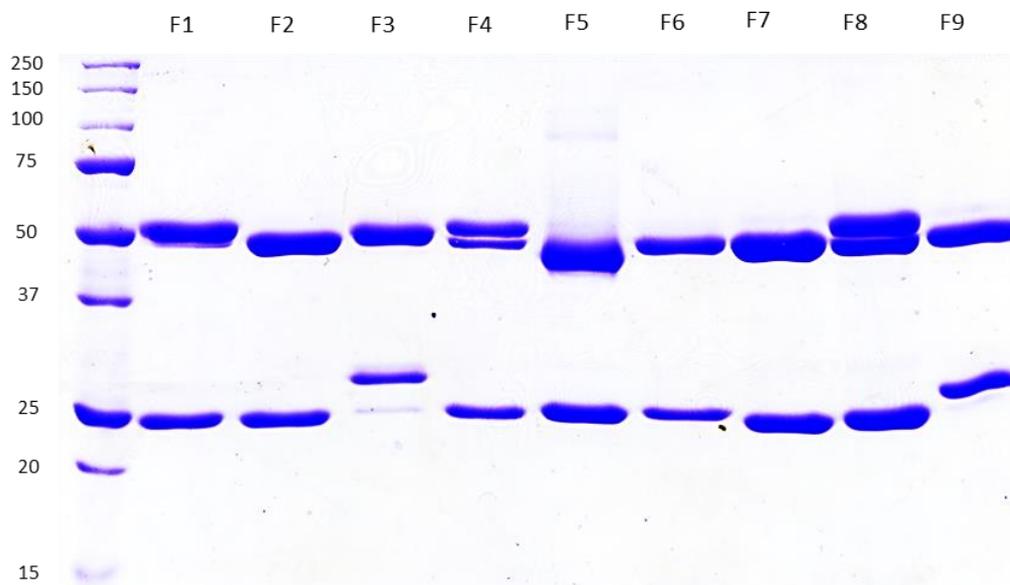
Des souris C57BL/6 femelles de 6 semaines (Charles River) et des souris FcγR KO, obtenues en collaboration avec P. Bruhns (Institut Pasteur Paris), ont reçu 100µl de mAb anti-FHA F3 ou F8 purifiés, ou de mAb anti-PT 1B7<sup>263</sup> purifié - à 750 µg/ml - ou de PBS en intrapéritonéal. 2h après l'injection, les souris ont été anesthésiées avec 100 µl d'un mélange xylazine-kétamine par voie intrapéritonéale, puis infectées avec 10<sup>5</sup> BPSM/20 µl par la voie intranasale. 3h après l'infection, des souris non-immunisées ont été sacrifiées par dislocation cervicale pour évaluer l'état de colonisation au temps 0. Les poumons ont été récupérés dans 1 ml de PBS. 7 jours après l'infection, les souris ont été sacrifiées pour récupérer les poumons de la même façon que ci-dessus. Les poumons ont été broyés par un homogénéiseur (Ultra-Turrax T25, IKA), puis le broyat a été centrifugé 10 min à 300 x g puis 100µl du surnageant a été prélevé et dilué en série au 1/10<sup>ème</sup> dans du PBS. 100 µl du surnageant pour les différentes dilutions ont été étalées sur boîte BG avec streptomycine à 100 µg/ml final. Les boîtes ont été incubées 4 à 5 jours à 37°C avant le comptage CFU.

## **B. Caractérisation de la structure des mAbs anti-FHA et de la liaison FHA - mAbs anti-FHA**

La culture de 9 hybridomes différents, notés de F1 à F9, produisant des mAbs dirigés contre l'adhésine majeure de *B. pertussis*, la FHA, a été réalisée dans l'objectif d'éclaircir le rôle de la FHA dans la protection médiée par les vaccins aP malgré des rapports conflictuels sur la comparaison d'efficacité des vaccins mono- ou bi-composés.

Dans un premier temps, nous avons comparé la taille des différents mAbs, produits et purifiés au laboratoire par SDS-PAGE pour apprécier les différences entre chaînes lourdes (HC) et chaînes légères (LC) (**Fig.25**). Le gel dénaturant montre pour tous les mAbs, à l'exception de F9, une protéine de 25 kDa, la taille attendue

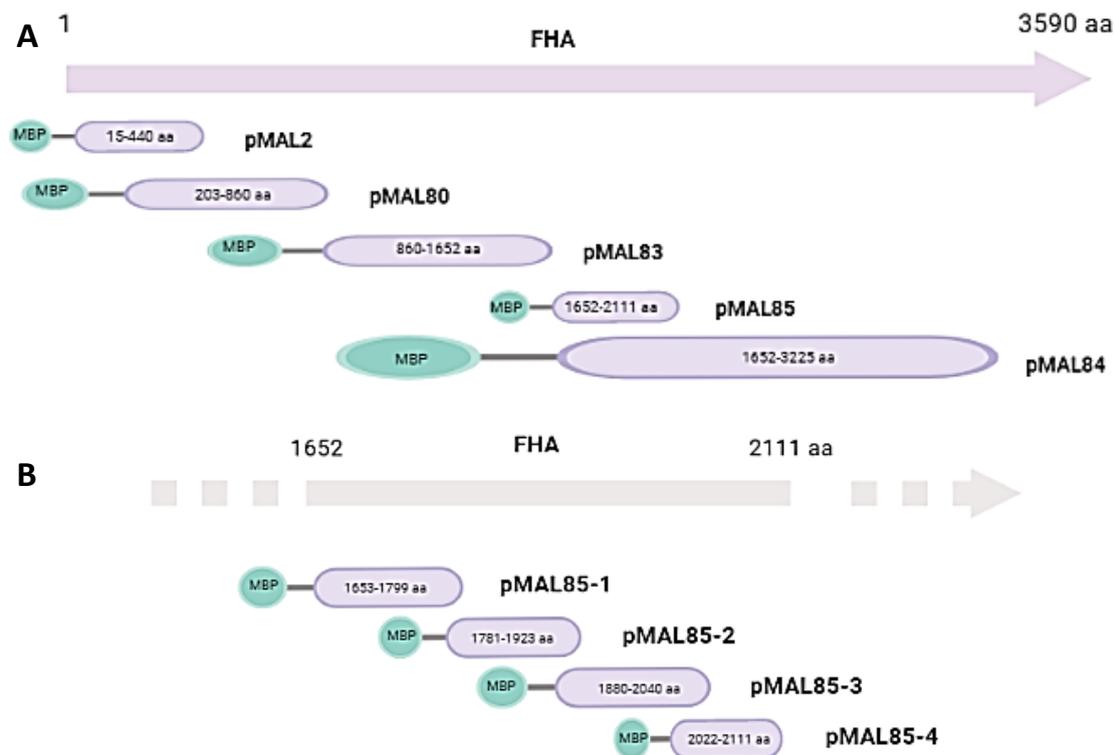
pour la LC. Le mAb F3 semble avoir 2 LC de tailles et de proportions différentes, une bande majeure > 25 kDa et une bande mineure à 25 kDa. On observe que le mAb F9 possède une taille de LC > 25 kDa, malgré la présence d'un effet de bord visible sur le gel. La taille des HC est d'environ 50 kDa pour les 9 mAbs. Cependant, les mAbs F4 et F8 présentent 2 tailles de HC en équimolarité. La différence de poids moléculaire < 5 kDa de certains mAbs par rapport aux tailles attendues pour les HC et LC pourrait suggérer la présence d'une modification post-traductionnelle (MPT). La distinction des 2 HC pour les mAbs F4 et F8 semble indiquer une répartition inégale de ces MPT sur la partie Fc ou Fab. En revanche, pour le mAb F3, il semble que la partie Fab de la LC soit présente sous 2 formes, dont une forme majoritaire avec un poids moléculaire supérieur aux valeurs attendues. Parmi les MPT possibles, la glycosylation est la modification majeure qui donne à l'anticorps sa spécificité de liaison, sa stabilité et ses fonctions effectrices<sup>264</sup>. Des expériences complémentaires de déglycosylation sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, les conditions de production *in vitro* de mAbs ont également un impact sur le profil de glycosylation<sup>265</sup>, c'est pourquoi pour le reste des expériences, les aliquots provenant d'une même production d'anticorps ont été utilisés afin de limiter une hétérogénéité possible dans la structure des mAbs produits.



**Figure 25:** Gel SDS-polyacrylamide après purification du surnageant des 9 hybridomes produisant des mAbs anti-FHA, noté de F1 à F9. Le marqueur de taille se trouve à l'extrême gauche du gel, et les tailles sont exprimées en kDa. Les chaînes lourdes se trouvent à environ 50 kDa et les chaînes légères à 25 kDa. Ce gel est représentatif et a été reproduit au moins 2 fois pour chaque mAb.

Ensuite, nous avons isotypé les 9 mAbs anti-FHA à l'aide de bandelettes d'isotypage pour caractériser davantage les HC et LC. Les mAbs produits par les hybridomes possèdent tous une LC  $\kappa$  et sont tous d'isotype IgG1 sauf le mAb F3 qui est d'isotype IgG2a. Les IgG2a ont la capacité d'induire des réponses ADCC et CDC, contrairement aux IgG1 incapables d'activer l'ADCC et très peu compétents pour initier la CDC.

Afin de déterminer les épitopes pour chaque mAb produit, nous avons utilisé des constructions génétiques codant pour des protéines hybrides entre la « maltose-binding protein » (MBP) et différents fragments de FHA. La FHA sécrétée est une longue protéine de 220 kDa, issue de la traduction du gène *fhaB* qui code l'adhésine FHA immature de 370 kDa. Les fragments couvraient la presque totalité de la FHA avec la protéine codée par pMAL2 à l'extrémité N-terminale, suivi par les protéines codées par pMAL80 et pMAL83, puis le pMAL84 qui chevauche la protéine codée par pMAL85 (**Fig.26A**). Seule la construction pMAL80 a été réalisée au cours de la thèse, les autres étaient déjà présentes dans le laboratoire. Après transformation des bactéries avec les plasmides et induction d'expression, suivies de l'extraction protéique et de la purification par chromatographie d'affinité, la



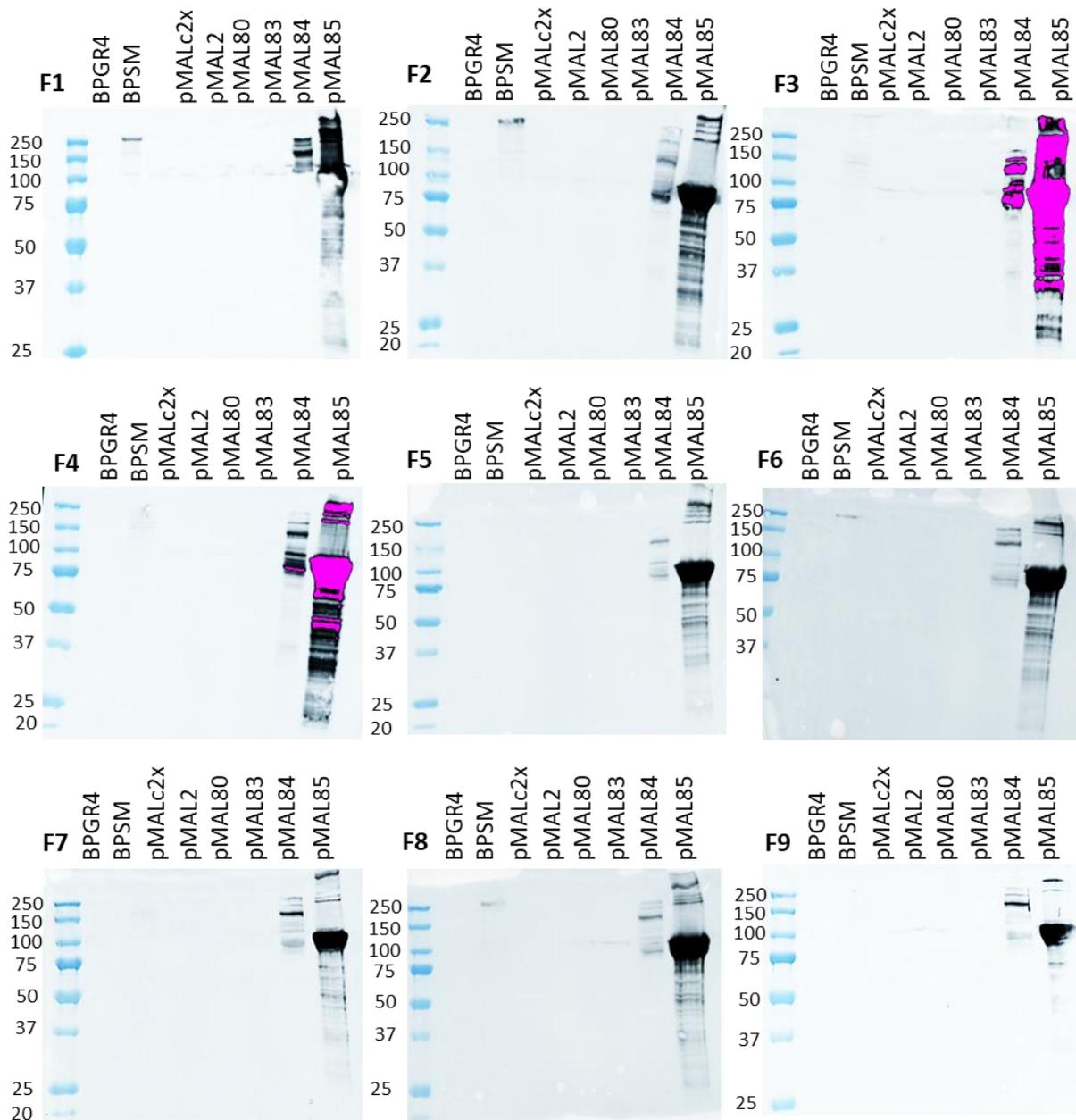
**Figure 26:** Représentation des constructions des protéines hybrides constituées de la « maltose-binding protein » (MBP) et des fragments (précisés en acides aminés, aa) issus de FHA. **(A)** Identification des protéines codées par pMAL2 (de 15 à 440 aa), pMAL80 (de 203 à 860 aa), pMAL83 (de 860 à 1652 aa), pMAL84 (de 1652 à 3225 aa) et pMAL85 (de 1652 à 2111 aa). **(B)** Identification des sous-fragments de la protéine codée par pMAL85 en celles codées par pMAL85-1 (de 1653 à 1799 aa), pMAL85-2 (de 1781 à 1923 aa), pMAL85-3 (de 1880 à 2040 aa) et pMAL85-4 (de 2022 à 2111 aa).

taille de chaque protéine a été confirmée par électrophorèse à savoir 86 kDa, 116 kDa, 132 kDa, 208 kDa et 94 kDa pour les protéines codées par pMAL2, pMAL80, pMAL83, pMAL84 et pMAL85, respectivement, et par western-blot avec un anticorps anti-MBP qui marque cette cible à environ 42 kDa. Ces protéines chimériques ont été analysées par western-blot pour déterminer les épitopes propres à chacun des 9 mAbs anti-FHA. Les 9 mAbs reconnaissent des épitopes présents dans les protéines codées par pMAL84 (208 kDa) et pMAL85 (94 kDa) uniquement (**Fig.27**), indiquant que les 9 épitopes se trouveraient dans la région commune à ces deux fragments, des acides aminés 1652 à 2111 de la FHA. Il n'y avait pas de liaison non-spécifique à la MBP comme observé par l'absence de bande pour les puits contenant le pMALc2x. De plus, les mAbs F1, F2, F6 et F8 se fixaient à la FHA mature qui est sécrétée dans le surnageant de BPSM, bande à 250 kDa, alors que les mAbs F3 et F4 se fixaient faiblement à celle-ci. Pour ces deux mAbs, la taille de la bande révélée dans le surnageant de BPSM était d'environ 150 kDa, correspondant certainement à un produit de dégradation de la FHA mature. En revanche, pour les mAbs F5, F7 et F9, il n'y avait pas de reconnaissance de la FHA dans le surnageant de BPSM. Ces différences suggèrent des propriétés de fixation à l'antigène différentes entre les mAbs et/ou la présence d'épitopes cachés ou conformationnels. Les profils de dégradation des chimères MBP-FHA, très sensibles à la protéolyse, étaient visibles sur les membranes.

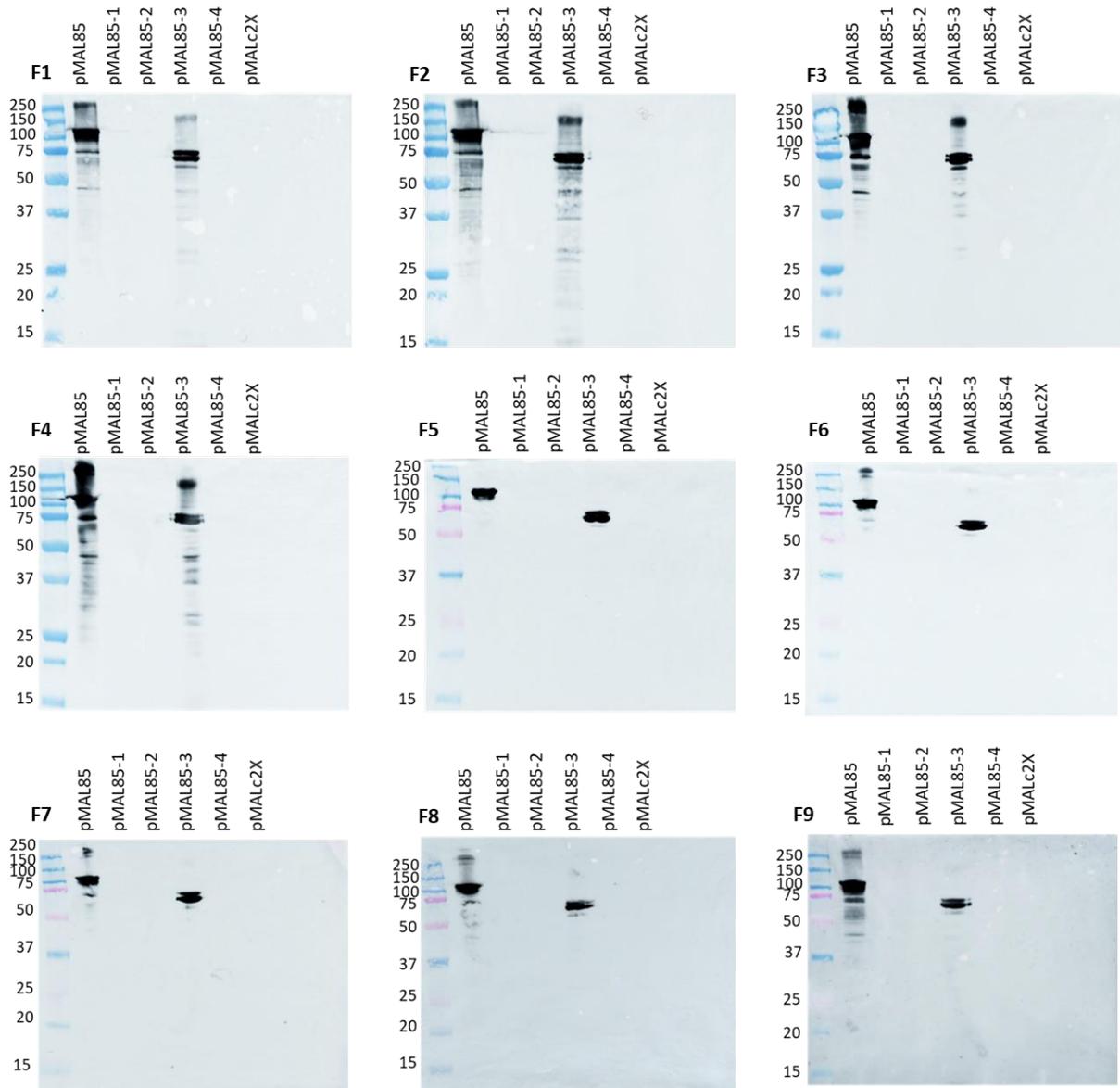
Une étude prédictive d'épitopes B linéaires sur la FHA à l'aide du logiciel IEDB Analysis Resource (avec la méthode BepiPred Linear Epitope Prediction v1.0, <http://tools.iedb.org/bcell/>), a prédit 8 séquences, d'un minimum de 10 aa, pouvant être reconnues comme épitopes dans la région 1652-2111 aa de la FHA. Nous avons donc découpé cette région en 4 sous-fragments chevauchants clonés dans pMALc2x, notés de pMAL85-1 à pMAL85-4, afin de déterminer plus précisément la zone de fixation des mAbs sur la FHA (**Fig.26B**). De même que précédemment, les 9 mAbs se fixaient sur la protéine codée par pMAL85 mais pas sur celle codée par pMALc2x, et les 9 mAbs se fixaient également tous sur le même sous-fragment des protéines codées par pMAL85 et pMAL85-3 (59 kDa), suggérant que la région de fixation se trouve entre les aa 1880 et 2040 de la FHA (**Fig.28**). C'est dans cette région que se trouve un épitope de 19 aa prédit avec le plus haut score pour le fragment du pMAL85 par BepiPred.

L'immuno-domaine de la FHA reconnu par les 9 mAbs se situerait donc dans la région 1880-2040aa, et les épitopes reconnus seraient probablement linéaires. Ces résultats concordent avec une étude menée sur 22 mAbs anti-FHA reconnaissant un même épitope dans la région 1655-2111 aa<sup>260</sup>. De plus, les IgG anti-FHA présents dans les séra d'individus convalescents, vaccinés avec wP et pour la plupart des vaccinés avec aP, reconnaissent également cette région. Ces résultats confirment

l'importance de cette portion de la FHA pour susciter une réponse anticorps. En effet, cette portion de la FHA est structurée en hélice  $\beta$  avec des motifs répétés et accessibles aux anticorps. Par ailleurs, dans cette même étude, il a été montré qu'après plusieurs administrations de vaccin aP, un haut titre d'anticorps anti-FHA révélerait une 2<sup>ème</sup> région de fixation des IgG sur la FHA correspondant à la région de la protéine codée par pMAL80, observation que nous n'avons pu confirmer. En outre, la fragmentation du pMAL85-3 en 10 fragments d'une trentaine d'acides aminés se chevauchant d'environ 15 aa a été effectuée par la surexpression de gènes synthétiques. La production de ces peptides (< 4 kDa) nécessite toutefois d'être optimisée dans la mesure où nous n'avons pas pu en obtenir suffisamment pour avoir des premiers résultats concluants.

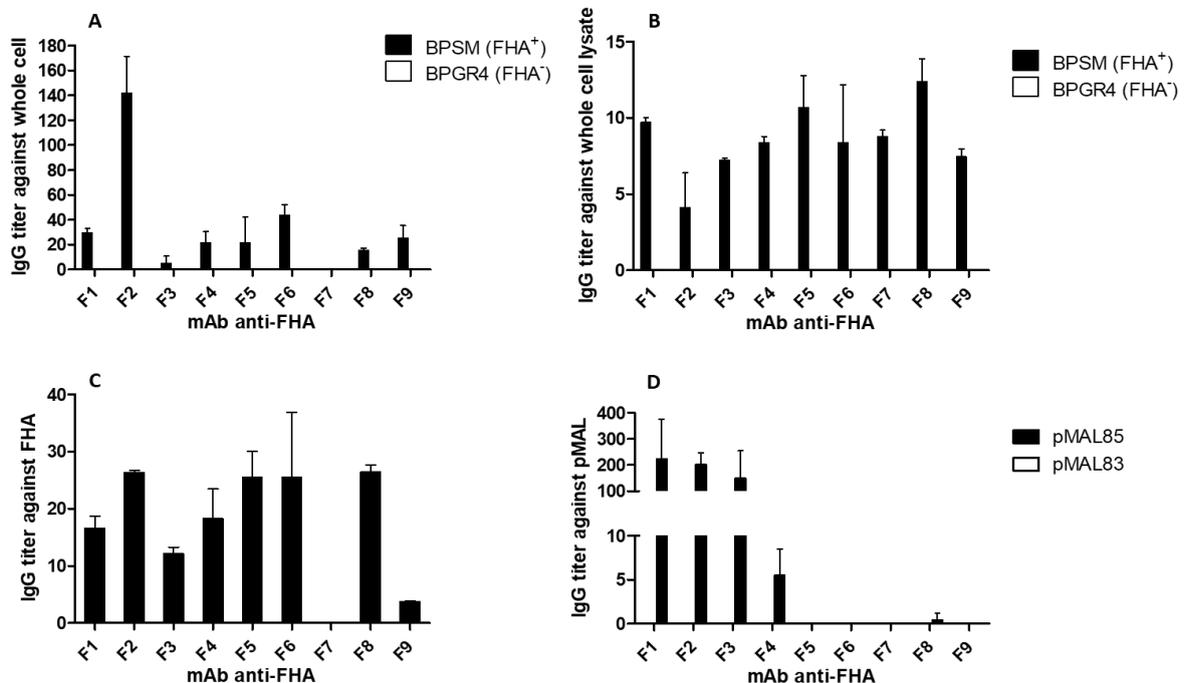


**Figure 27:** Western-Blot des 9 mAbs anti-FHA, notés de F1 à F9, sur les protéines purifiées codées par le plasmide vide - pMALc2x- et des plasmides contenant les troncs de FHA - pMAL2/80/83/84/85. Des puits contrôles BPSM et BPGR4 contiennent les protéines de surnageant de culture correspondants. A l'extrême gauche des membranes se trouve le marqueur de taille, avec les poids moléculaires en kDa. La coloration rose indique une surexposition de la membrane. Ces gels ont été réalisés en duplica.



**Figure 28:** Western-Blot des 9 mAbs anti-FHA, notés de F1 à F9, sur les protéines purifiées codées par le plasmide vide - pMALc2x- et des plasmides contenant les troncats de FHA – pMAL85 et pMAL85-1/2/3/4. A l'extrême gauche des membranes se trouve le marqueur de taille, avec les poids moléculaires en kDa. Ces gels ont été réalisés en dupliqua.

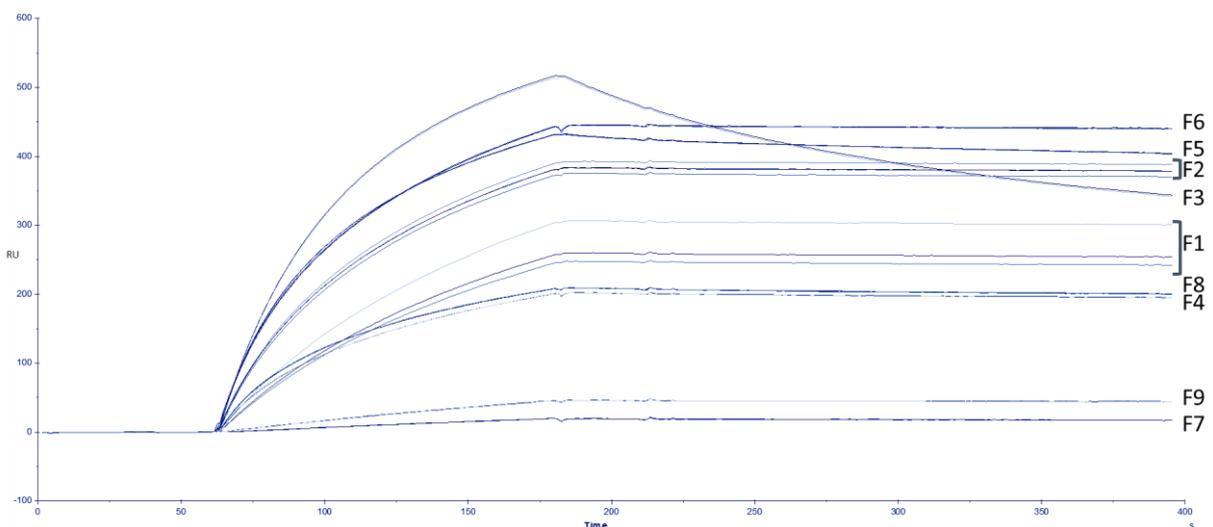
Pour compléter l'étude sur les épitopes et la capacité de reconnaissance des mAbs pour la FHA, nous avons effectué une série d'ELISA dont l'objectif était de montrer d'éventuels épitopes conformationnels à la surface des bactéries, dans des lysats bactériens, sur de la FHA entière et sur les protéines hybrides purifiées codées par pMAL83 et pMAL 85 (**Fig.29**). Le mAb F2 se fixait davantage à la surface des bactéries que les autres mAbs, contrairement à F3 qui se fixait peu et F7 qui ne semblait pas se fixer aux bactéries dans ces conditions (**Fig.29A**). Il est à noter que la FHA est une adhésine sécrétée donc retrouvée majoritairement dans les surnageants de culture, mais pendant sa maturation elle est transitoirement attachée à la membrane externe de *B. pertussis*. En parallèle, des bactéries entières nous avons réalisé le même ELISA sur bactéries lysées. Sur ces lysats le mAb F2 se fixait le moins comparé aux autres mAbs, alors que le F7 était capable de se lier à la FHA des bactéries lysées, contrairement aux bactéries entières (**Fig.29B**). Cependant, la fixation du mAb F7 sur la FHA purifiée n'était pas détectable (**Fig.29C**), et le mAb F9 se fixait peu, alors que les autres mAbs se liaient à la FHA de façon équivalente. Enfin, nous avons comparé les capacités de fixation des mAbs sur les protéines codées par les différents pMAL. Les mAbs F5, F6, F7 et F9 ne parvenaient pas à fixer la protéine codée par pMAL85 et très peu pour F4 et F8 en ELISA (**Fig.29D**) alors que cette liaison était visible pour tous les mAbs en western-blot. Les sites de fixation des F1, F2 et F3 ne semblaient pas être encombrés par la MBP ou étaient facilement accessibles dans les protéines non dénaturées.



**Figure 29:** ELISA réalisés sur les 9 mAbs anti-FHA, (A) contre des bactéries entières BPSM (FHA<sup>+</sup>) et BGR4 (FHA<sup>-</sup>), (B) contre un lysat des bactéries BPSM (FHA<sup>+</sup>) et BGR4 (FHA<sup>-</sup>), (C) contre de la FHA purifiée ou (D) contre les protéines de fusion purifiées codées par pMAL85 et pMAL83. BPSM et pMAL83 étaient utilisés comme contrôles négatifs. Les unités sont exprimées en titres IgG. Les résultats présentés sont issus de 2 expériences indépendantes.

Ces résultats suggèrent que le mAb F7 fixerait soit un épitope linéaire, aucune fixation sur cellules entières et sur FHA purifiée mais sur cellules lysées, soit un épitope peu accessible qui est masqué en ELISA probablement par un encombrement de la MBP, malgré la présence d'un polylinker entre la MBP et la protéine d'intérêt, qui n'est plus gênant en western-blot. Cette analyse est également valable pour le mAb F9 qui se comporte de la même façon que le F7 en ELISA. En revanche, le mAb F2 pourrait se fixer sur un épitope conformationnel, perte de la liaison après lyse bactérienne, et serait facilement accessible, liaison sur la FHA purifiée. Par ailleurs, il semble que les mAbs F5 et F6 possèdent des propriétés de fixation à l'antigène semblables, ainsi que les mAbs F4 et F8. L'impact de la MBP dans la détermination des épitopes devra être prise en compte pour les futures analyses en envisageant un clivage enzymatique pour séparer la MBP.

Pour compléter l'analyse de la liaison antigène-anticorps, des expériences préliminaires de résonance des plasmons de surface (SPR) ont été engagées pour mesurer la force de cette liaison. Après avoir optimisé les conditions de pH pour le ligand FHA, les analytes mAbs et les concentrations de ces derniers à utiliser, nous n'avons pas pu atteindre le stade de saturation lors de la phase d'association par manque d'analyte. Des expériences supplémentaires sont donc requises pour déterminer les constantes d'association  $k_a$ , de dissociation  $k_d$ , et d'équilibre  $K_D$ . Néanmoins, un sensorgramme représentant les profils d'association et de début de dissociation obtenus pour chaque mAb, à la concentration finale de 100 nM, en fonction du temps est représenté ci-dessous (**Fig.30**).



**Figure 30:** Sensorgramme des profils d'association et de dissociation (mesuré en « resonance unit », RU) des 9 mAbs anti-FHA (100 nM) à la FHA (10 µg/ml) en fonction du temps (en secondes). Cette représentation regroupe les courbes de 3 expériences indépendantes pour chaque mAb.

Nous avons pu distinguer 4 profils des courbes différentes, caractérisant des propriétés de fixation à l'antigène. Le taux de fixation des anticorps (analytes) sur l'antigène (ligand) était proportionnel aux unités de résonance (RU), donc plus la RU est élevée, plus il y avait d'anticorps fixé sur l'épitope de l'antigène. Nous pouvions distinguer, (1) les mAbs F7 et F9 qui se fixaient faiblement à la FHA, (2) le mAb F1 dont les replicas étaient hétérogènes et les mAbs F8 et F4 très semblables qui se fixaient moyennement à la FHA, (3) les mAbs F5 et F6 dont le profil d'association à la FHA était similaire, mais avec un profil de dissociation différent avec la liaison du F5 qui semblait être moins stable, et le F2 dont le triplica était irrégulier, et (4) le F3 se fixait en quantité sur la FHA mais cette liaison n'était pas pérenne dans le temps et est plus rapide à se dissocier pour le F3 que pour les autres mAbs.

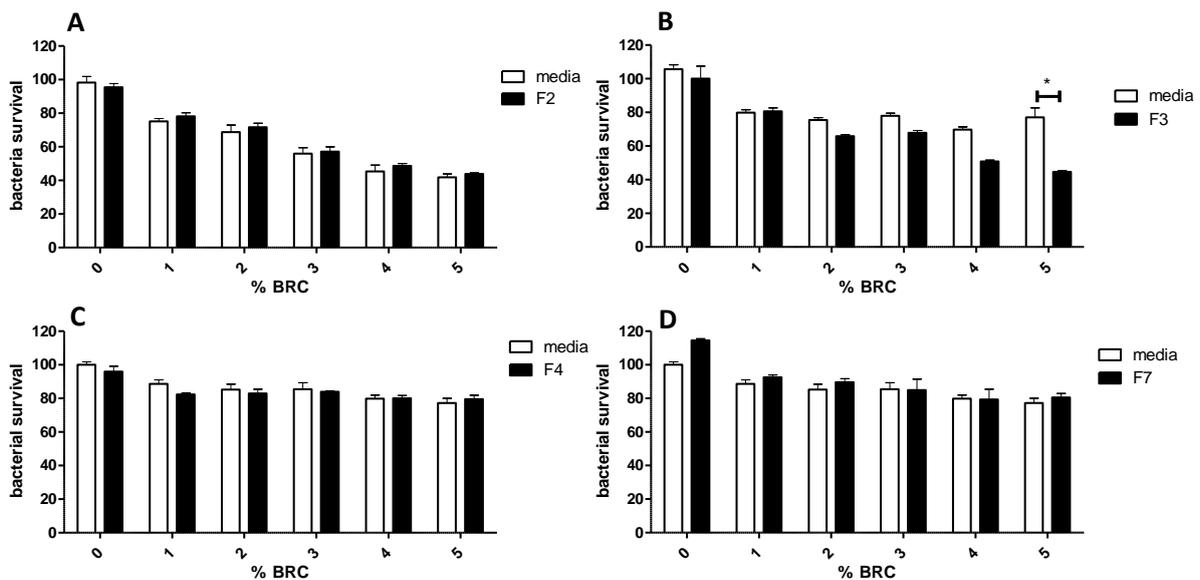
Les résultats obtenus en SPR pour les mAbs F7 et F9 concordent avec ceux obtenus en ELISA sur la FHA ainsi que les mAbs F5 et F6 d'une part et F4 et F8 d'autre part en considérant leur profil d'affinité au ligand et de fixation à l'antigène. Enfin, le F3 était le seul anticorps IgG2a et sa dissociation rapide de la FHA pourrait témoigner d'une liaison instable. Malgré le partage d'une même région immunogène sur la FHA pour des mAbs dont l'affinité au ligand et la structure diffèrent, l'étude de l'activité fonctionnelle exercée pour chaque mAb pourrait éclaircir la relation structure-fonction des anticorps.

### C. Activité fonctionnelle des mAb anti-FHA *in vitro*

L'activité bactéricide des mAbs, appelée CDC, a été évaluée en BGIA avec le complément de bébé lapin (BRC) comme source externe de complément (**Fig.31**). En effet, nous avons choisi cette source de complément dans un souci de similarité de composition des protéines du complément entre mammifères rongeurs. Le BGIA a été réalisé sur 16h d'incubation pour éventuellement observer des effets bactériostatiques sur la croissance des bactéries liés à la présence des mAbs uniquement. De plus, nous avons réalisé le BGIA en  $10^6$  CFU/puit afin d'observer ces effets dans une meilleure dynamique qu'à  $10^4$  CFU/puit. Dans la mesure où les IgG1 n'induisent pas de CDC, seuls 3 mAbs IgG1 – F2, F4 et F7- ont été testés en parallèle du seul mAb anti-FHA IgG2a, F3. Ils représentaient chacun un profil différent en SPR, décrit plus haut, le F7 se fixait faiblement à la FHA, le F4 moyennement et le F2 davantage.

Aucun des 4 mAbs testés ne semblait induire d'effet bactériostatique sur la croissance des bactéries après comparaison des conditions avec ou sans (media seul) anticorps à 0% de BRC. Avec des concentrations croissantes de BRC, de 1% à

5%, les mAbs F2 (**Fig.31A**), F4 (**Fig.31C**) et F7 (**Fig.31D**) ne semblaient pas induire d'effet inhibiteur de croissance sur *B. pertussis*. Au contraire, le mAb F3 (**Fig.31B**) induisait une inhibition significative qui était dépendante de complément à 5% de BRC. Nous avons remarqué que l'activité du lot de BRC testé avec le F2 était plus inhibiteur que dans le cadre des essais avec les autres mAbs. Ce phénomène peut s'expliquer par l'utilisation de lots de BRC différents entre les différents BGIA. Nous confirmons par cette approche que le mAb IgG2a F3 a la capacité d'induire la CDC contrairement aux autres mAb IgG1 testés.



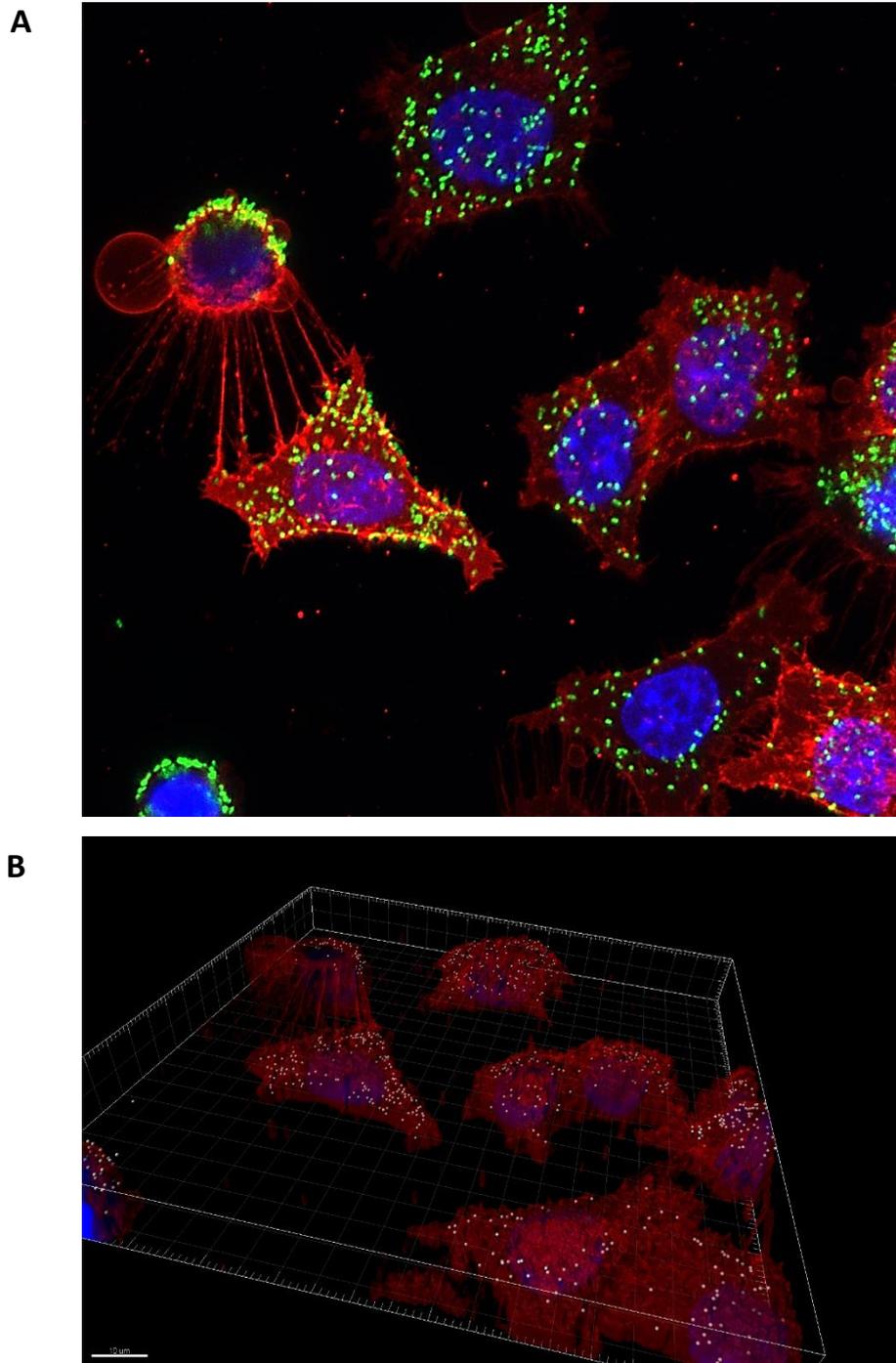
**Figure 31:** Résultats des BGIA réalisés sur les mAbs F2 (A), F3 (B), F4 (C) et F7 (D) en fonction de doses croissantes de complément de bébé lapin (BRC). Les barres noires représentent l'activité du mAb seul à 0% de BRC et l'activité anticorps dépendante de complément de 1% à 5 % de BRC. Les barres blanches représentent le maximum de croissance des bactéries à 0% de BRC et l'activité du complément seul de 1% à 5 % de BRC. Ces graphes représentent la moyenne de 3 expériences. Un test Kruskal-Wallis montre une significativité pour le F3 à 5% de BRC,  $p_{value}=0.0237$ .

Un autre rôle possible des mAbs anti-FHA serait d'empêcher ou de limiter la colonisation des bactéries au niveau des cellules épithéliales en bloquant leur adhérence ou en limitant l'internalisation des micro-organismes dans les cellules de l'hôte. En effet, il a été montré que les anticorps anti-Fim ainsi que les anticorps anti-FHA étaient capable de réduire l'adhérence bactérienne sur les cellules épithéliales pulmonaires A549<sup>266</sup> et laryngeales Hep-2<sup>267</sup>, mais que seuls les anticorps anti-FHA inhibaient l'adhérence des bactéries sur cellules bronchiales NCI-H292. La FHA serait donc impliquée dans les processus précoces et tardifs de colonisation dans l'ensemble du tractus respiratoire. De plus, la présence de *B. pertussis* internalisées dans des cellules alvéolaires A549 a également été montrée dès 30 min d'infection<sup>95</sup>. Nous avons donc mis au point un protocole pour observer l'adhérence et l'internalisation cellulaire des bactéries sur cellules épithéliales

bronchiques A549 par microscopie confocale en microplaque à 96 puits afin d'étudier l'interférence des mAbs sur ces événements.

Sur un champ de la plaque, les cellules dont le noyau a été coloré en bleu et le cytoplasme en rouge, ont été infectées par les bactéries colorées en vert. 20 images en coupe horizontale (plan Z) et espacées de 1  $\mu\text{m}$  ont été projetées sur un même plan (**Fig.32A**). Cette projection était basée sur le maximum d'intensité des pixels. Ainsi, une image 2D a été créée à partir de données 3D grâce aux logiciels Zen2 et ImageJ. Nous avons observé une accumulation de bactéries au niveaux des cellules épithéliales et une répartition homogène sur les cellules vivantes, de formes étoilées. Afin de visualiser l'internalisation des bactéries dans les cellules A549, une représentation 3D, grâce au logiciel Imaris, de ce même champ a été réalisée après déconvolution des images, pour réduire la diffraction du signal et donc améliorer la résolution des images, afin d'identifier une bactérie par un point (**Fig.32B**). Les bactéries étaient enchevêtrées dans les villosités des membranes cellulaires eucaryotes mais n'étaient pas internalisées. Ces observations ne confirment pas le travail de Ishibashi et al., 2001<sup>95</sup>, mais des différences substantielles comme le choix d'une MOI à 100 et la privation en nutriment des cellules avant l'infection pourraient expliquer ces différences. Dans ces conditions d'infection, les bactéries n'étaient pas internalisées par les cellules A549, par conséquent ce protocole appliqué à l'étude des mAbs anti-FHA n'a pu déterminer que leur rôle dans l'inhibition de fixation à la surface des cellules épithéliales.

Nous avons débuté l'étude des propriétés anti-adhérentes des mAbs par F3 et F2, puisque ces 2 anticorps se liaient bien à la FHA mais que F2 se fixait plus facilement sur les bactéries entières que F3. Nous avons donc préincubé les anticorps, à des concentrations finales de 40 et 20  $\mu\text{g/ml}$ , pendant 30 min à 37°C avec les bactéries avant l'infection des cellules eucaryotes. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure de constater une inhibition de fixation des bactéries à la surface des A549 après traitement avec les mAbs F3 et F2. Des études supplémentaires avec les autres mAbs et avec une gamme de concentration d'anticorps plus variée<sup>268</sup> (de 40  $\mu\text{g/ml}$  à 1.25  $\mu\text{g/ml}$  en diluant en série au 1/2) devraient être menées. En effet, il est possible qu'une forte concentration en anticorps puisse avoir un effet délétère sur la fixation à l'antigène. La mise au point du test anti-adhérence en microplaque, réalisée au cours de cette thèse, permettra donc d'optimiser et de tester plusieurs conditions et plusieurs mAbs en même temps, en limitant considérablement la quantité d'anticorps purifiés à utiliser.

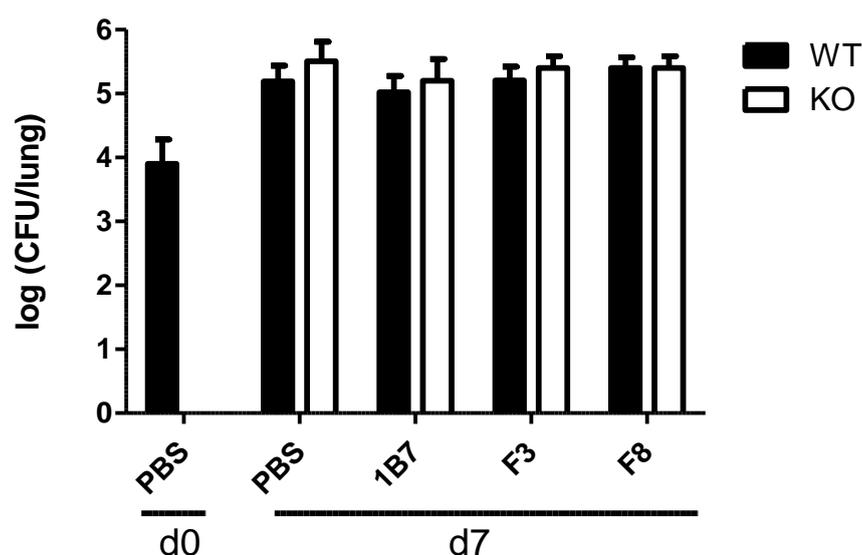


**Figure 32:** Infection de cellules épithéliales alvéolaires A549 après 2h d'incubation avec une souche de *B. pertussis* exprimant la GFP, observée en microscopie optique confocale. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu avec du DAPI et le cytoplasme est marqué par un traceur rouge. (A) Projection d'intensité maximale obtenue par empilement des 18 coupes horizontales (Z stack) espacées de 0.56 µm. (B) Déconvolution et représentation 3D de l'image A.

## D. Activité *in vivo* des mAbs dans la protection contre une infection à *B. pertussis*

Pour compléter la caractérisation des mAb anti-FHA, nous avons réalisé des expériences de transfert passif des mAbs F3 et F8 purifiés, avant une infection intranasale par la souche de laboratoire BPSM. Ceci nous permettrait de relier l'activité bactéricide observée en BGIA pour le F3 et une éventuelle protection. En effet, les IgG2a sont capables d'induire la voie CDC, importante dans la protection contre *B. pertussis*, et l'ADCC, pour laquelle son implication dans la protection contre la coqueluche n'a pas été démontrée. Le mAb F8 est un IgG1, incapable d'induire la voie ADCC et faiblement la voie CDC, mais il se fixe bien à la FHA malgré qu'il soit constitué de 2 HC dont les poids moléculaires sont différents. D'autres activités comme l'ADCP ou l'agglutination pourraient jouer un rôle *in vivo* dans la protection médiée par ces mAbs contre la coqueluche. Nous avons également comparé le F3 et le F8 avec le mAb 1B7 anti-PT, qui se fixe à la sous-unité S1 de la PT. C'est un IgG2a qui exerce des fonctions neutralisantes sur la toxine, atténue la lymphocytose, et protège contre une infection létale chez les souris<sup>231</sup>.

Dans le cadre d'une collaboration, nous avons obtenu des souris FcγR null, lesquelles ont été intégrées à cette étude afin de montrer éventuellement l'importance d'une réponse anticorps à médiation cellulaire. Les souris sauvages



**Figure 33:** Résultats de colonisation pulmonaire 3h après infection (d0) et 7 jours après infection (d7) de souris sauvages (WT) ou déficiente pour les récepteurs Fcγ (KO) immunisés avec des mAbs ou non. Les résultats sont exprimés en échelle logarithmique. Les groupes PBS représentent la moyenne de 3 souris et les groupes de mAbs anti-FHA (F3 et F8) et anti-PT (1B7) représentent la moyenne de 4 souris.

C57BL/6 et FcγR null, sur fond C57BL/6, sont donc immunisées et infectées avec  $10^5$  BPSM, par voie intranasale, en parallèle.

Dans le groupe PBS, nous constatons une colonisation classique dans les poumons de souris sauvage (WT) entre le jour 0 (d0), soit 3h après l'infection, et le jour 7 (d7) avec une augmentation de la charge bactérienne de l'ordre de 50 fois plus (1.5 log) (**Fig.33**). Il n'y avait pas de différence à d7 dans le groupe PBS entre WT et FcγR null (KO), suggérant que ces récepteurs ne sont pas impliqués dans la clairance pulmonaire du pathogène 7 jours post-infection. Enfin, l'immunisation préalable des souris avec des mAbs ne semblait pas avoir d'effet protecteur contre la colonisation pulmonaire à d7, ni chez les souris sauvages ni chez les souris déficientes. Ces résultats peuvent s'expliquer de différentes manières, (1) soit les effets protecteurs des mAbs ne s'observent pas à d7 mais pourraient s'observer à des temps plus courts comme 1 jour post-infection indiquant un effet protecteur bref ou un délai dans la colonisation ou (2) soit que la quantité de mAb injectée était insuffisante ou au contraire trop importante engendrant une perte d'efficacité comme ça avait déjà été montré pour l'anticorps 1B7<sup>269</sup>. Les travaux de Sato et al., 2010<sup>243</sup>, montrent un effet protecteur du 1B7 dans les poumons 14 jours après une infection par particules aérosolisées de *B. pertussis*. Néanmoins cet effet protecteur n'a pas été démontré sur de très jeunes souris (6 jours). Ce constat reflète l'importance de l'état de maturité du système immunitaire pour induire certains types d'effets protecteurs.

## E. Bilan sur l'étude des mAbs anti-FHA

L'étude structurale et fonctionnelle des mAb anti-FHA a permis de montrer la variété des affinités et des forces de liaison à l'antigène, la ségrégation de l'activité bactéricide en fonction de l'isotype et la différence de structure des HC et LC malgré le même isotype. Malgré cette disparité, il semble que les 9 mAbs testés reconnaissent la même région immunogène sur la FHA, indiquant qu'un épitope majeur serait susceptible de générer différents anticorps fonctionnels.

## **VII. Etude de la réponse anticorps dans le modèle souris**

La souris est le modèle animal historique d'étude de la coqueluche. Dans cette partie, la réponse anticorps a été étudiée après immunisation passive ou active. Les expériences de transfert passif de sérum provenant de souris naïves ou immunisées (aP, wP) précédant une infection à *B. pertussis* ont été réalisées en parallèle d'une vaccination optimale (aP, wP) suivie de l'infection. Lors de la vaccination optimale, une cinétique de la réponse anticorps sérique avant et après infection est réalisée ainsi que la réponse anticorps mucoale après infection. L'objectif de ce travail était d'établir un profil immun pour lequel un ou des indicateur(s) immunologique(s) de la réponse humorale pourrai(en)t définir un corrélant de protection contre la colonisation.

Par ailleurs, ce travail sur la réponse humorale a été réalisé en parallèle avec l'étude de la réponse cellulaire réalisée au sein du laboratoire.

### **A. Matériel et méthodes**

#### *Expérience de transfert passif de sérums naïf et immuns*

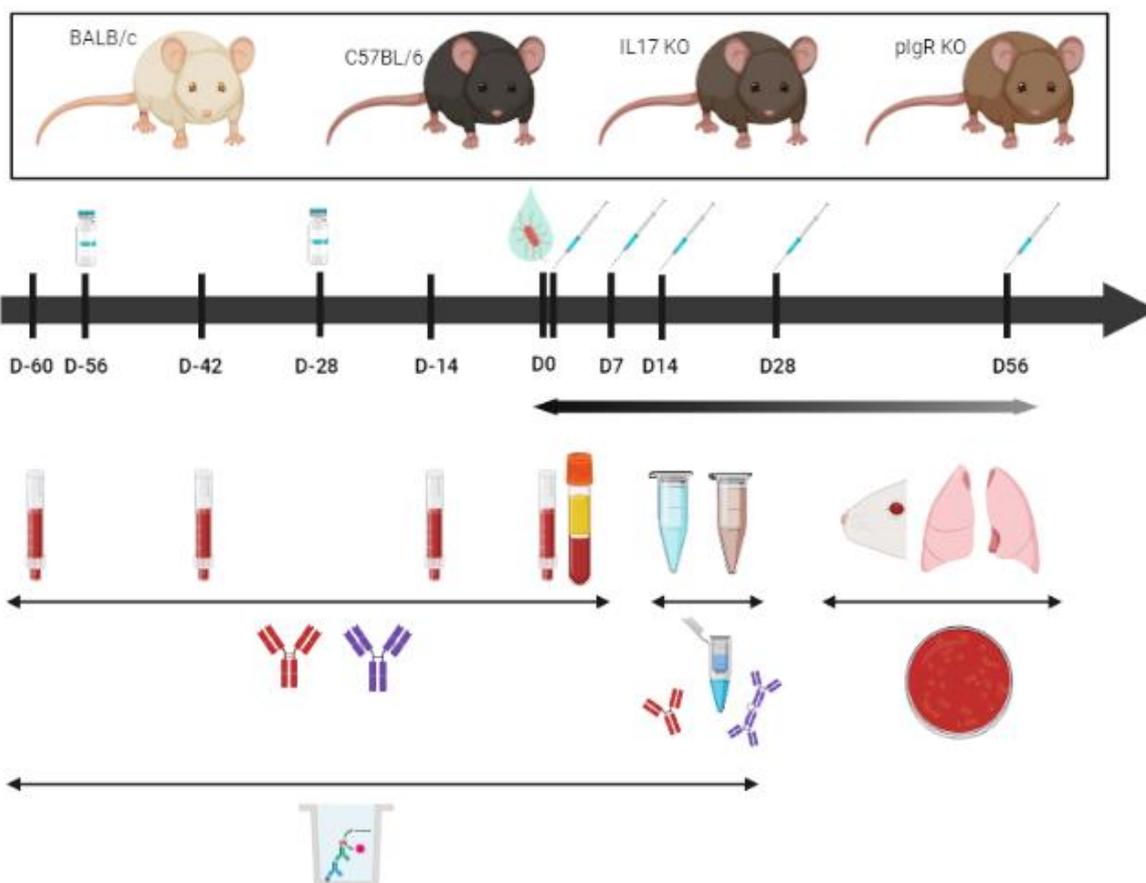
Des souris BALB/c (Charles River) femelles de 6 semaines ont été vaccinées avec le vaccin acellulaire Infanrix hexa® (GlaxoSmithKline) ou le vaccin cellulaire Shan5® (Sanofi Pasteur) au 1/10<sup>ème</sup> de la dose humaine (50 µl) en injection sous-cutanée entre les 2 omoplates. 4 semaines après la 1<sup>ère</sup> vaccination, une 2<sup>ème</sup> dose a été inoculée, puis 2 semaines après le rappel les souris ont été euthanasiées par excès d'anesthésiant au pentobarbital sodique (EuthasolVet). En parallèle, des souris naïves ont également été sacrifiées. Le sang a été prélevé dans la cage thoracique et récolté dans des tubes (Sarstedt) contenant un activateur de coagulation afin de mieux séparer le sérum des autres éléments sanguins. Les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 2.000 x g et les surnageants ont été additionnés et aliquotés. 100 µl de ces séra provenant de souris naïves ou vaccinées avec aP ou wP ont été administrés par injection intrapéritonéale à des souris naïves. 3h après ce transfert passif de sérum, les souris ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine, atropine et valium et infectées avec 20µl de BPSM à la concentration finale de 5.10<sup>7</sup> CFU/ml par la voie intranasale. 7 jours après infection, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les poumons et nez<sup>148</sup> ont été récupérés dans des tubes contenant 1 ml de PBS.

### *Expérience d'immunisation active*

Des souris mâles et femelles BALB/c et C57BL/6 commerciales, âgées de 6 semaines (Charles River), et des souris mâles et femelles plgR -/-<sup>270</sup> et IL17 -/-, âgées de 5 à 15 semaines, produites à l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille, ont été vaccinées avec soit le vaccin acellulaire Infanrix hexa® (GlaxoSmithKline) ou soit le vaccin cellulaire Shan5® (Sanofi Pasteur) au 1/10<sup>ème</sup> de la dose humaine (50 µl) en sous-cutanée entre les 2 omoplates. 4 semaines après la 1<sup>ère</sup> vaccination, une 2<sup>ème</sup> dose a été inoculée. Juste avant et 14 jours après la 1<sup>ère</sup> vaccination, ainsi que 14 jours après le rappel et juste avant l'infection, du sang a été prélevé dans la veine sous-mandibulaire à l'aide de capillaire contenant un activateur de coagulation (Sarstedt). 4 semaines après le rappel, les souris ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine, atropine et valium pour les BALB/c et un mélange xylazine et de kétamine pour les autres souches, puis infectées avec 20µl de B1917 à la concentration finale de 5.10<sup>7</sup> CFU/ml ou 5.10<sup>6</sup> CFU/ml par voie intranasale. Suite à l'infection, soit 3h (d0), 1 semaine (d7), 2 semaines (d14), 4 semaines (d28) et 8 semaines (d56), des souris naïves, vaccinées avec wP et aP ont été euthanasiées par excès d'anesthésiant au pentobarbital sodique (EuthasolVet). Dans cet ordre, le sang, puis les BALF suivi des poumons, ensuite le lavage nasal et enfin le nez ont été récoltés. Le sang a été prélevé dans la cage thoracique après rupture des gros vaisseaux et récolté dans des tubes (Sarstedt) contenant un activateur de coagulation. Les BALF ont été réalisées en rinçant une fois les poumons avec 1 ml de PBS contenant un inhibiteur de protéase (Roche) avec une canule droite insérée par la trachée jusqu'à la bifurcation trachéale. Les poumons ont été récupérés dans des tubes contenant 1 ml de PBS. Puis, la trachée a été libérée de sa gaine pour y faire une entaille et créer un passage pour la canule droite. La canule a été insérée jusqu'au pharynx où 1ml de la solution utilisée pour les BALF a été injectée drainant le nez pour obtenir le lavage nasal. Le nez a été prélevé selon le protocole publié dans Solans et al., 2018 (**Annexe2**). Schéma du calendrier en **Figure 34**.

### *Traitement des échantillons*

Le sang prélevé à la joue dans les capillaires et le sang prélevé dans la cage thoracique ont été centrifugés à 2.000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants, constituants le sérum, ont été aliquotés et stockés à -20°C. Les lavages broncho-alvéolaires (BALF) ont été stockés -20°C et les lavages de nez ont été concentrés avec des colonnes de concentration de protéine (Amicon, 50 kDa) selon le protocole du fabricant. Sur ces concentrats, la concentration totale en protéines a été déterminée avec le kit BCA (Thermo). Les organes, nez et poumons, ont été broyés avec un homogénéiseur (Ultra-Turrax T25, IKA), puis les broyats ont été centrifugés 10 min à 300 x g puis 100 µl de surnageant ont été prélevés et dilués en série au 1/10<sup>ème</sup> dans 900 µl de PBS. 100 µl du surnageant, pour différentes dilutions, ont été étalées sur boîtes BG avec streptomycine à 100 µg/ml final. Les boîtes ont été incubées 4 à 5 jours à 37°C avant le comptage CFU.



**Figure 34:** Calendrier de vaccination, d'infection et de prélèvements des échantillons biologiques.

### ELISA

Dans des plaques à 96 puits (NUNC Maxisorp), 100µl de lysat total de BPSM à 1 µg de protéines totales/puit, ont été déposés dans les puits de la plaque. Cette étape de fixation de l'antigène a été réalisée à 4 °C sur la nuit. Ensuite les puits de la plaque ont été lavés 3 fois avec une solution de lavage constituée de PBS et de Tween-20 à la concentration finale de 0.1%. La plaque a été ensuite saturée en protéines aspécifiques avec la solution de lavage contenant de la caséine à la concentration finale de 2% pendant 2h à température ambiante. Puis, 100µl des séra naïfs, aP et wP PBS ont été ajoutés dans les puits tests en suivant une gamme de dilution au ½, alors que du PBS seul a été ajouté aux puits contrôles. Après 2h d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés 3 fois avec la solution de lavage avant d'ajouter un les anticorps secondaires couplé à la HRP (Abcam). L'anti-IgG total, anti-IgG1, l'anti-IgG2a, l'anti-IgG2b et l'anti-IgG3 de souris ont été dilués au 1/6.000ème, alors que l'anti-IgA a été dilué au 1/4.000ème dans le PBS. Enfin, les puits ont été lavés 5 fois avec la solution de lavage. La révélation a été faite par ajout de 100µl de TMB (ThermoFisherScientific) et la réaction stoppée avant saturation du signal avec 50

$\mu\text{l}$  d'acide phosphorique 10 mM. La plaque a été lue avec le lecteur de plaque (ELx800, BioTek) à 450nm. Les titres ELISA ont été calculées selon la formule suivante :

$$x = \frac{(\log_{10}(3 * \bar{x}_{DO(\text{puits contrôlés}))}) - (\text{ordonnée à l'origine}(\text{dilution}^{-1}; \log_{10}(DO(\text{puits tests}))))}{\text{pente}(\text{dilution}^{-1}; \log_{10}(DO(\text{puits tests})))}$$

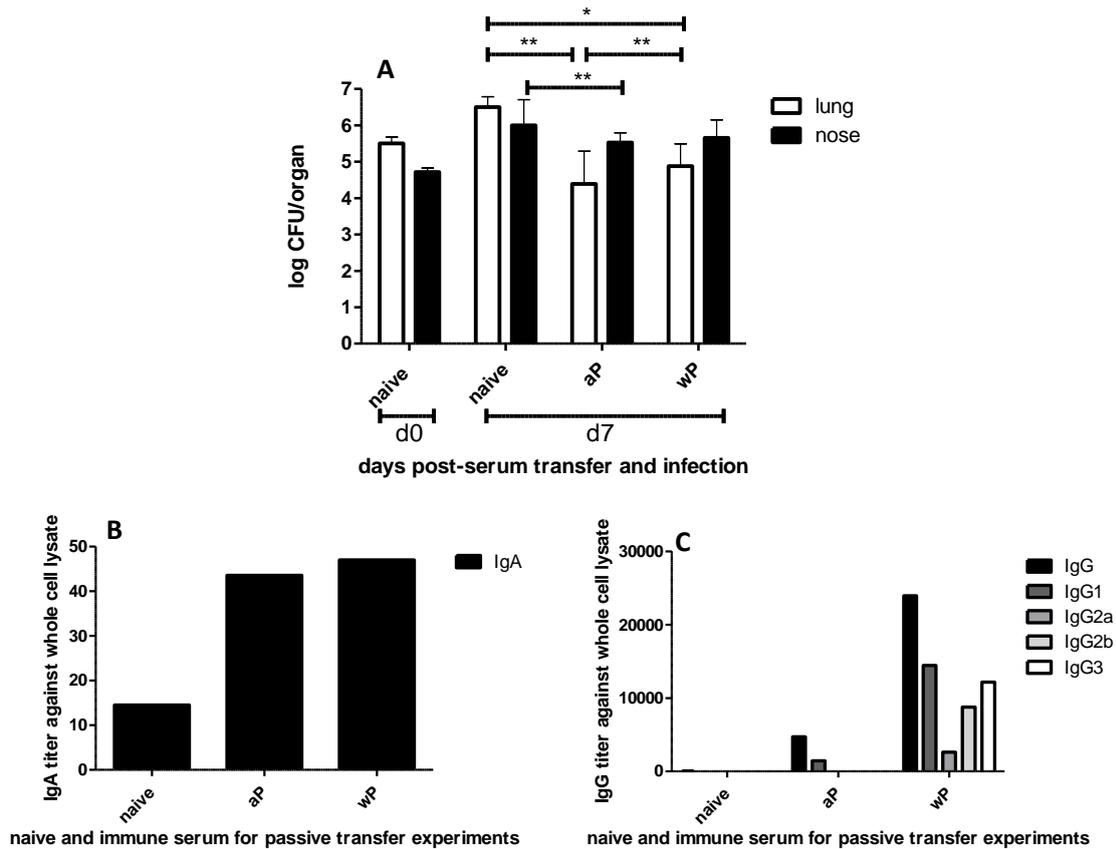
Le calcul du coefficient de détermination  $r^2$  et la dispersion des mesures en nuage de point ont permis de vérifier la qualité de l'ELISA.

### BGIA

Dans une plaque à 96 demi-puits, 10  $\mu\text{l}$  d'une culture de  $2.10^7$  CFU/ml de BPSM ont été déposés dans chaque puit avec 10  $\mu\text{l}$  des séras utilisés pour les expériences de transfert passifs. L'activité inhibitrice de ces séras naïfs et immuns (après vaccination avec aP ou wP), a été évaluée par une gamme de dilution au 1/2 des séras à partir du 1/8ème jusqu'au 1/512ème. Les séras ont été non-décomplémentés (noté S) ou décomplémentés (noté SHI), à 56°C pendant 30 min, puis dilués dans du SS. La plaque a été centrifugée à 10 x g pendant 1 min, puis incubée sans agitation à 37°C. Après 4h d'incubation, 20  $\mu\text{l}$  de BacTiter-Glo (Promega, G8230) ont été ajoutés pour chaque puits, puis incubés pendant 10 min à température ambiante sur un agitateur à plaques orbitales. Après cette incubation, le signal de luminescence a été lu avec un luminomètre (Berthold Centro XS<sup>3</sup> LB 960) avec les paramètres suivants : 5 min de délai par plaque et un temps de comptage de 0,1 seconde par puit. Les résultats exprimés en RLU ont été normalisés en fonction du maximum de survie des bactéries dans du SS, sans sérum, et exprimés en pourcentage de survie. Les expériences ont été réalisées en triplicata indépendants et pour chaque expérience l'aire sous la courbe (AUC) a été calculée à partir du pourcentage de survie en fonction des dilutions croissantes de sérum, pour les 3 groupes de souris (naïf, aP, wP) et pour les 2 conditions de traitement du sérum (S, SHI). Donc, plus l'AUC est faible, plus le sérum est inhibiteur

### **B. Transfert passif de séras issus de souris naïves ou immunisées avec un vaccin aP ou un vaccin wP précédent une infection à *B. pertussis***

Afin d'évaluer l'importance de la réponse anticorps sérique dans la protection contre une infection à *B. pertussis*, des souris ont été immunisées préalablement avec des séras provenant de souris naïves ou vaccinées soit avec un aP soit avec un wP avant d'être infectées avec la souche de laboratoire BPSM (**Fig.35**).



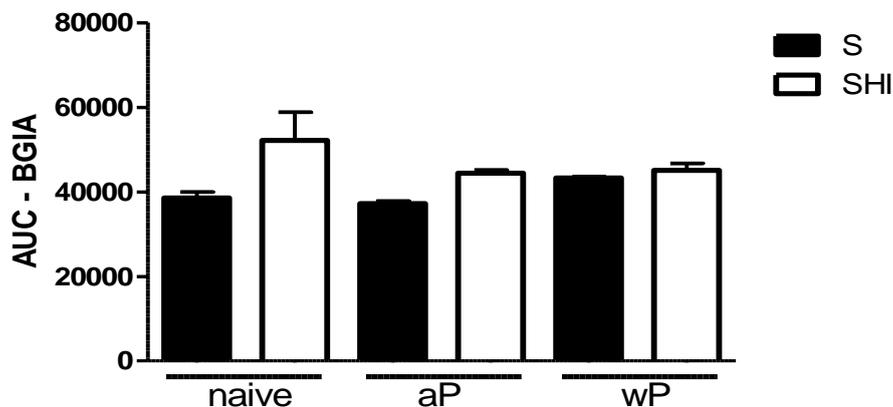
**Figure 35** : Résultats d'expérience d'immunisation passive. **(A)** Colonisation nasale (noir) et pulmonaire (blanc) 3h (d0) et 7 jours (d7) après infection intra-nasale de souris préalablement immunisées avec du sérum issu de souris naïves (naïve), ou vaccinées avec Infanrix® (aP) ou Shan5 (wP). Ce graphique représente la médiane de 2 expériences indépendantes avec n(naïve)=6 et n(aP/wP)=9. Un test Mann-Whitney a été appliqué. ELISA sur les sérums transférés contre un lysat total de bactéries pour les mesures d'anticorps sériques **(B)** IgA et **(C)** IgG totaux, IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3.

7 jours après infection, les souris ayant reçu du sérum de souris naïves avaient une charge bactérienne augmentée d'un factor 10 une semaine post-infection et qui est équivalente entre nez et poumons (**Fig.35A**). Les souris ayant été immunisées préalablement avec du sérum de souris vaccinées aP avaient une charge bactérienne significativement inférieure dans les poumons ( $p=0.0026$ ) et dans le nez ( $p=0.0048$ ) par rapport aux souris immunisées avec du sérum de souris naïves, indiquant le rôle protecteur des anticorps sériques induits après vaccination aP. Cependant, le niveau de protection contre la colonisation nasale n'est que très modeste. Les souris du groupe wP montraient également une charge bactérienne significativement moins élevée dans le poumon uniquement ( $p=0.036$ ) mais qui était moins importante que dans les poumons des souris du groupe aP ( $p=0.0047$ ). Ces résultats indiquent que les anticorps systémiques médiés par la vaccination aP limitent la colonisation pulmonaire et nasale à d7 et que la vaccination wP limite la colonisation pulmonaire uniquement dans un modèle d'immunisation passive.

Les séra de souris naïves étaient constitués d'un niveau basal d'IgA et d'IgG. En revanche, la titration des anticorps sériques montrait une induction similaire des IgA après une vaccination aP et wP (**Fig.35B**) et une plus forte induction des IgG totaux pour la vaccination wP que pour la vaccination aP (**Fig35C**). De plus, l'isotypage des IgG indiquait une induction unique d'IgG1 et dans une moindre mesure d'IgG2a post-vaccination avec aP, alors que la vaccination avec wP induisait tous les isotypes. La différence dans ces conditions de vaccination entre les 2 types de vaccins ne semble pas résider sur la réponse sérique IgA mais plutôt sur la réponse IgG, tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Néanmoins, la protection contre la colonisation pulmonaire et nasale médiée par le transfert passif de sérum aP semble être plus efficace que celle médiée par wP malgré que le sérum wP soit plus concentré et diversifié en IgG.

Des études complémentaires sur le répertoire d'anticorps (sérotypage des IgG anti-FHA, anti-PT et anti-PRN) exposé suite à une vaccination avec aP ou wP, ainsi que la fonctionnalité de ces anticorps induits, devraient aider à comprendre comment ce transfert passif d'anticorps sériques induit une protection mucoale.

Le test BGIA a été utilisé pour caractériser ces séra transférés afin d'évaluer les propriétés inhibitrices sur la croissance de *B. pertussis* qui pourraient expliquer cette protection contre la colonisation du système respiratoire de la souris. Les séra non-décomplémentés étaient plus inhibiteurs que les séra décomplémentés et il ne semblait pas y avoir de différence entre les 3 groupes (**Fig.36**). Toutefois, l'activité inhibitrice des séra décomplémentés semblait plus élevée pour les groupes aP et wP. La différence entre l'activité inhibitrice des séra non-décomplémentés et décomplémentés était plus importante pour le groupe aP que pour le groupe wP. Cette observation suggérerait que les anticorps présents dans le sérum aP dépendent davantage de la présence du complément, alors que les anticorps présents dans le sérum wP auraient à la fois des activités inhibitrices dépendantes et indépendantes du complément.



**Figure 36:** Comparaison de l'activité inhibitrice des séra non-décomplémentés (S en noir) et décomplémentés (SHI en blanc) provenant de souris naïves ou vaccinées avec aP ou wP évaluée par BGIA. Les aires sous la courbe (AUC) représentent la survie estimée par BGIA en fonction des dilutions croissantes de sérum. Plus l'AUC est faible, plus le sérum est inhibiteur. Ce graphique représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

Au vu de ces résultats, il est difficile de conclure sur le fait que l'activité inhibitrice des anticorps induits par la vaccination avec aP dépend davantage de la présence de complément que les anticorps induits par le wP. Tout d'abord, parce que le sérum aP ne contient que des IgG1, très peu capables d'induire la voie CDC, contrairement aux IgG2a et IgG2b présents dans les séra wP. Il est donc étonnant de constater une protection nasale chez les souris aP, mais pas chez les souris wP, puisque (1) ces IgG transsudent au niveau de la muqueuse nasale où les protéines du système de complément sont sécrétées et exudées et (2) ces 2 vaccins induisent le même niveau sérique d'IgA. Cependant, le niveau de protection contre la colonisation nasale est très faible. Et ensuite, parce que le sérum aP semble être plus protecteur contre la colonisation pulmonaire que le sérum wP, alors que les IgG1 n'activent pas la voie ADCC, contrairement aux IgG-2a-2b-3. De plus, dans cette expérience, les séra issus des souris naïves étaient aussi inhibiteurs que ceux des souris vaccinées. Il est envisageable que l'application du BGIA sur les séra de souris ne soient pas encore optimisées et que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour évaluer la concentration optimale de bactéries à utiliser, étudier la possible présence d'éléments sériques inhibiteurs de croissance ou pour appliquer la recombplémentation systématique afin de préciser l'impact du complément dans l'inhibition de croissance.

Le transfert passif de séra de souris immunisées permet de montrer l'importance relative des anticorps sériques dans la protection pulmonaire (induit par aP et wP) et nasale (induit par aP) précoce.

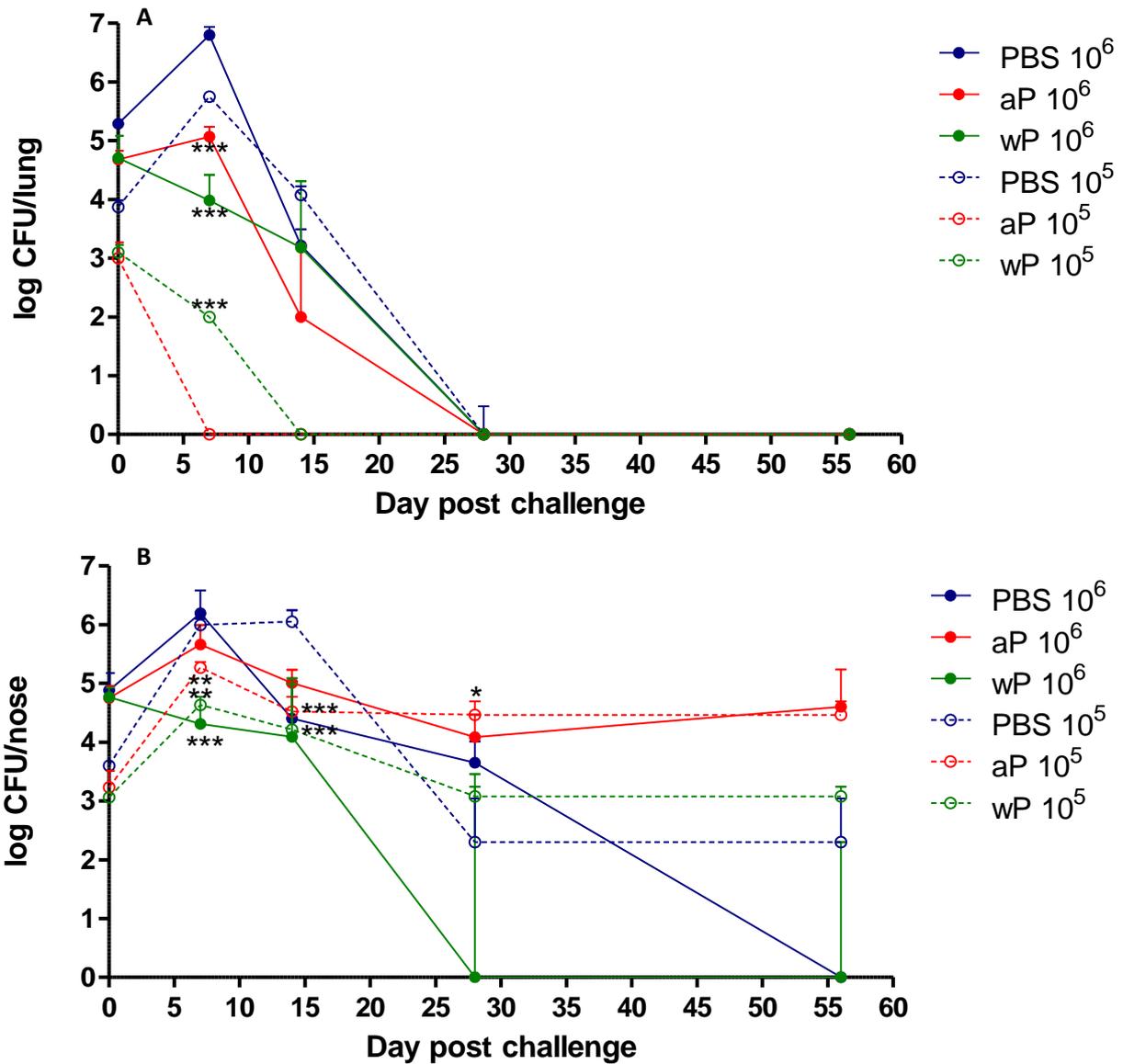
### C. Infection de souris naïves ou préalablement immunisées avec un vaccin aP ou un vaccin wP : étude de la réponse anticorps

Dans cette partie, nous traitons d'immunisation active, par opposition avec la partie précédente, suite à une infection ou une vaccination avec l'Infanrix® hexa (aP) ou Shan5 (wP). Ce travail se concentre sur la caractérisation quantitative (titration, isotypage) et qualitative (activité fonctionnelle *in vitro* et *in vivo*-cf. partie précédente) de la réponse anticorps afin de déterminer un ou des éventuel(s) marqueurs de protection contre la colonisation par *B. pertussis* du tractus respiratoire, supérieur et/ou inférieur. Ce travail est schématisé dans la **figure 34**.

## 1. Cinétique de colonisation

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux souris de phénotypes sauvages mais de fond génétique différent. En effet, selon la littérature, les souris C57BL/6 élaborent un profil cellulaire pro-Th1 alors que les souris BALB/c élabore un profil plutôt pro-Th2<sup>271</sup>. Cette prédisposition influence inévitablement la réponse cellulaire<sup>271</sup> mais également la réponse humorale<sup>272</sup> suite à une infection à *B. pertussis* ou une vaccination anti-pertussis. De plus, nous avons comparé l'impact de la dose infectieuse sur la colonisation nasale et pulmonaire afin de déterminer s'il existe un effet dose-réponse qui influence l'infectiosité et la persistance de *B. pertussis* et qui structure l'amplitude de la réponse immunitaire chez la souris.

La colonisation pulmonaire des souris BALB/c vaccinées aP et wP, et infectées avec  $10^6$  CFU B1917, montrait une protection similaire significative à d7 comparée aux souris naïves, ce qui correspond au pic de colonisation (**Fig.37A**). A cette dose d'infection, la clairance était effective à d28 pour les 3 groupes de souris. Le profil de colonisation des souris naïves infectées avec  $10^5$  CFU B1917 était proche de celle des souris infectées avec  $10^6$  CFU B1917, alors que la clairance était significativement plus rapide pour les souris vaccinées, soit à d7 pour le groupe aP et d14 pour le groupe wP. Dans la cavité nasale des souris infectées avec  $10^6$  CFU B1917, le pic de colonisation était observé à d7 pour les souris naïves et aP alors que les souris wP montraient une protection significative à d7 (**Fig.37B**). Ces dernières éliminaient la pathogène complètement à d28 alors que les souris naïves et aP étaient encore infectées. De plus, les souris aP n'avaient pas éliminé les bactéries à d56 et la colonisation nasale semblait être prolongée. A  $10^5$  CFU B1917, il y avait également une protection significative à d7 chez les souris wP mais aussi chez les souris aP qui perdurait jusqu'à d14. Les souris naïves et aP étaient incapables d'éliminer le pathogène dans la cavité nasale à d56 post-infection. Les résultats pour le groupe wP à d56 étaient conflictuels dans la mesure où 3 souris sur 5 n'étaient plus colonisées et les 2 autres l'étaient encore, au même niveau que les souris naïves. Il semblerait donc y avoir un effet dose-réponse de l'infection dans la colonisation pulmonaire des souris infectées mais pas vaccinées et une protection précoce des 2 vaccins. De même, nous avons observé un effet dose-réponse de l'inoculum d'infection sur (1) la clairance de la bactérie dans la cavité nasale des souris aP et naïves, qui semblait perdurer avec le plus faible inoculum de bactéries, et sur (2) la concentration finale de bactéries dans le nez des souris vaccinées avec aP, qui correspondait à la dose de l'inoculum.



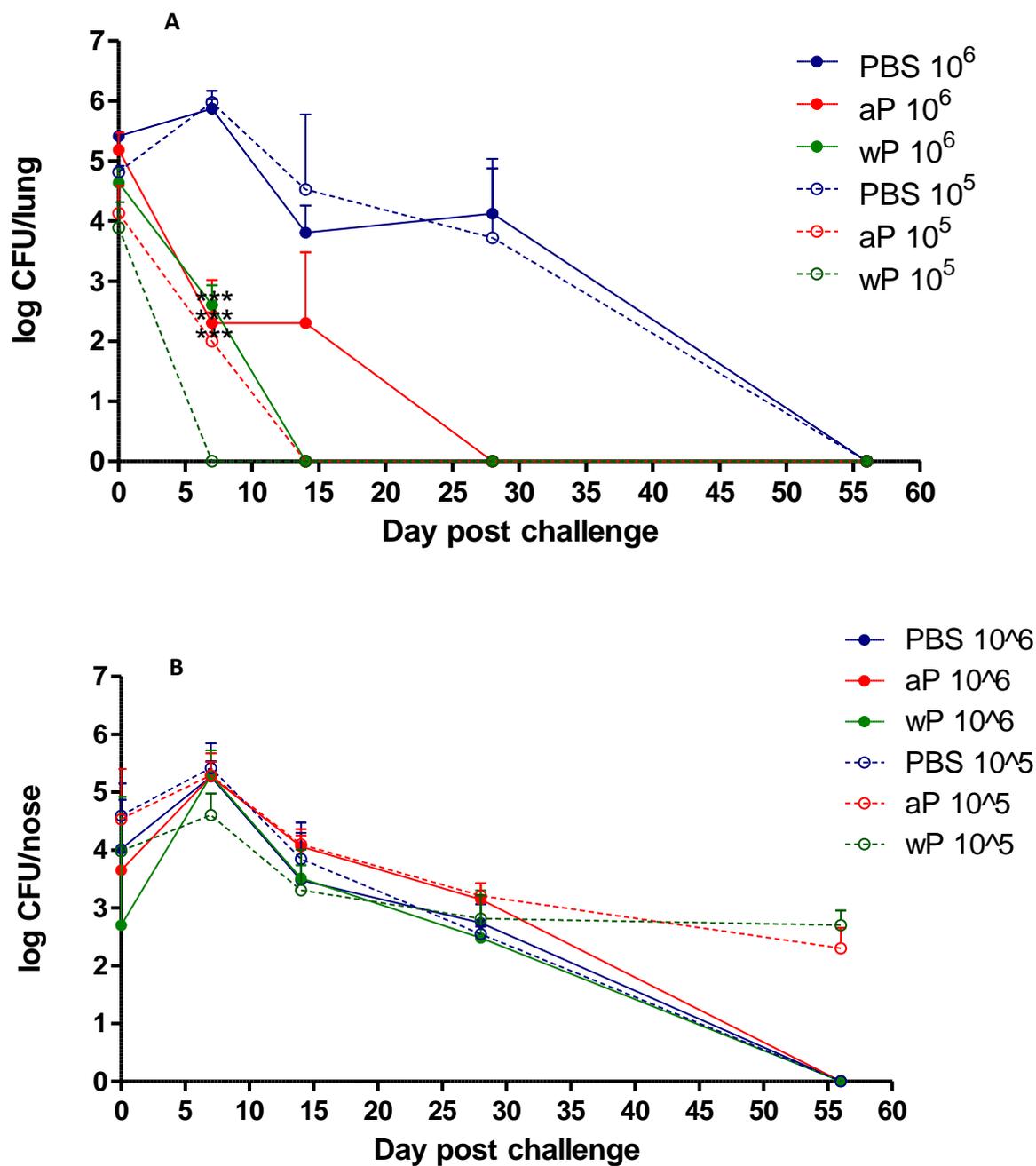
**Figure 37:** Cinétiques de colonisation de souris BALB/c. Les souris ont été vaccinées, par voie sous-cutanée, 2 fois à 4 semaines d'intervalle avec  $1/10^{\text{ème}}$  de la dose humaine d'Infanrix® hexa (aP-courbe rouge) ou Shan5® (wP-courbe verte) ou n'ont pas été vaccinés (PBS-courbe bleue). Les souris ont ensuite été infectées 4 semaines après la 2ème de dose de vaccin avec  $10^6$  CFU B1917 (trait plein) ou avec  $10^5$  CFU B1917 (trait pointillé) par voie intranasale. La colonisation pulmonaire (A) et nasale (B) a été évaluée à 3h (d0), 1 semaine (d7), 2 semaines (d14), 4 semaines (d28) et 8 semaines (d56) après infection. Chaque point de cinétique et chaque groupe de souris sont représentés par la médiane avec l'interquartile de  $n=5$  souris. Les statistiques sont réalisées avec un test Mann-Whitney, avec  $**p < 0.005$  et  $***p < 0.0005$ .

En parallèle, la colonisation de souris C57BL/6 avec 2 doses de B1917 a été analysée (**Fig.38**). A la dose infectieuse de  $10^6$  CFU B1917, les souris naïves éliminaient complètement le pathogène des poumons à d56 alors que les souris vaccinées aP à d28 et wP à d14 (**Fig.38A**). Les souris vaccinées étaient significativement protégées dès d7. Le profil de colonisation pulmonaire des souris naïves était similaire entre les doses d'inoculum, alors que les souris vaccinées wP n'étaient plus infectées dès d7 et aP dès d14 lorsqu'elles ont été infectées par  $10^5$  B1917. Le pic de colonisation nasale pour les 2 doses d'infection et pour tous les groupes de souris était à d7 et les nez de souris vaccinées et infectées à la plus faible dose contenaient toujours des bactéries à d56 malgré la clairance complète du groupe contrôle et des souris infectées avec la plus haute dose de bactéries (**Fig.38B**). Ces résultats montrent également un effet dose-réponse de la clairance du pathogène dans le poumon proportionnel à la dose d'inoculum uniquement pour les souris vaccinées. Ce phénomène est inversé dans la clairance nasale où il semble que les souris vaccinées éliminent moins efficacement les bactéries avec une plus faible dose d'infection.

En comparant les profils de colonisation pulmonaire obtenus pour les souris BALB/c et C57BL/6, nous avons remarqué que les souris naïves éliminaient le pathogène plus rapidement, pour les 2 doses, chez les souris BALB/c et que les deux souches de souris vaccinées éliminaient plus rapidement le pathogène après infection avec la plus faible concentration de bactéries inoculées. Concernant la colonisation nasale, les souris BALB/c vaccinées avec aP prolongeaient le portage de façon dose-indépendante, contrairement aux souris C57BL/6 vaccinées avec aP. De plus, il y avait un effet dose réponse où la clairance nasale, pour les 2 souches de souris vaccinées avec wP est retardée avec la dose de  $10^5$  CFU B1917. Les résultats obtenus pour les souris naïves et les souris vaccinées avec aP, BALB/c ou C57BL/6, étaient similaires avec des résultats du laboratoire publiés<sup>148</sup>.

Il semble donc que les vaccinations avec aP ou wP induisent une réponse immunitaire efficace contre la colonisation pulmonaire, proportionnelle à la dose d'infection et quel que soit le fond génétique des souris. En revanche, les souris BALB/c étaient moins longtemps infectées, peu importe la dose, que les souris C57BL/6, suggérant que la réponse immunitaire innée liée à *B. pertussis* est différente entre ces 2 souches murines.

L'efficacité de la vaccination contre la colonisation nasale des 2 souches murines, pour le vaccin wP est dépendante de la dose infectieuse, c'est-à-dire qu'elle est optimisée avec une dose de  $10^6$ , suggérant l'existence d'un seuil critique pour déclencher une réponse immunitaire efficace. Pour le vaccin aP, la colonisation nasale des BALB/c n'était pas dose-dépendante de la dose infectieuse.



**Figure 38:** Cinétiques de colonisation de souris C57BL/6. Les souris ont été vaccinées, par voie sous-cutanée, 2 fois à 4 semaines d'intervalle avec  $1/10^{\text{ème}}$  de la dose humaine d'Infanrix® hexa (aP-courbe rouge) ou Shan5® (wP-courbe verte) ou n'ont pas été vaccinés (PBS-courbe bleue). Les souris ont ensuite été infectées 4 semaines après la 2ème dose de vaccin avec  $10^6$  CFU B1917 (trait plein) ou avec  $10^5$  CFU B1917 (trait pointillée) par voie intranasale. La colonisation pulmonaire (A) et nasale (B) a été évaluée à 3h (d0), 1 semaine (d7), 2 semaines (d14), 4 semaines (d28) et 8 semaines (d56) après infection. Chaque point de cinétique et chaque groupe de souris sont représentés par la médiane avec l'interquartile de  $n=5$  souris. Les statistiques sont réalisées avec un test Mann-Whitney, avec \*\*\*  $p < 0.0005$ .

Ceci indique qu'avec un profil immunitaire pro-Th2, comme les BALB/c, la vaccination aP prolongerait le portage de *B. pertussis* dans la cavité nasale.

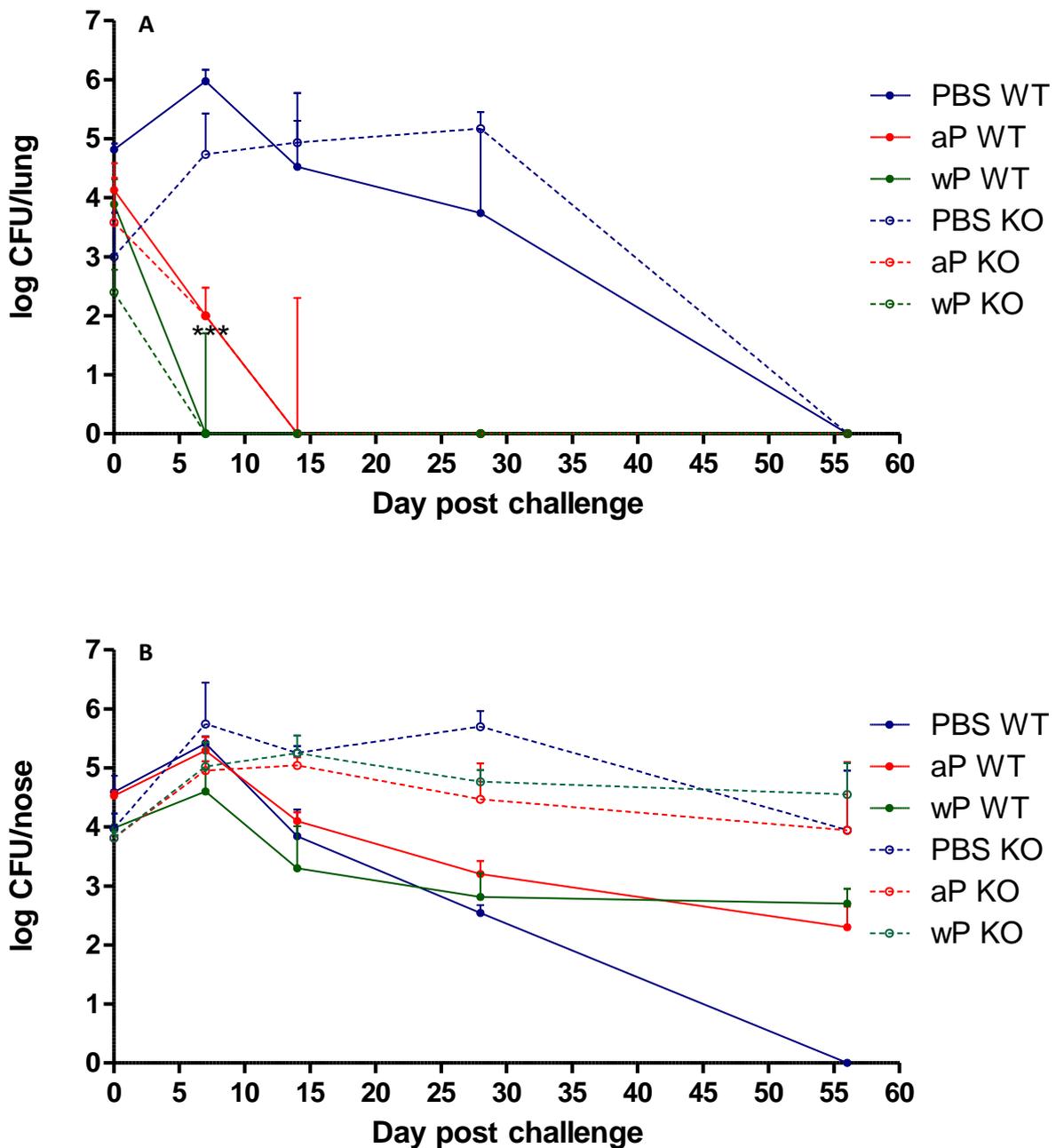
Etant donné que les vaccins aP et wP protègent contre l'infection pulmonaire mais pas contre la colonisation nasale, on a examiné l'importance de la réponse humorale mucoale. En effet, même s'il a été montré que la protection contre une colonisation nasale, trachéale et pulmonaire ne dépendait pas de la présence d'IgA dans un contexte d'infection naturelle<sup>147</sup> le rôle de ces anticorps dans le tractus respiratoire supérieur dans un contexte de vaccination anti-pertussis n'est pas clairement établi. Pour ce faire, des souris déficientes en IL17, cytokine impliquée dans l'expression de pIgR et la sécrétion des sIg<sup>273</sup>, et des souris déficientes en pIgR, récepteur responsable de la sécrétion des IgA et IgM sériques vers les muqueuses en sIgA et sIgM, ont été vaccinées avec aP ou wP et infectées avec B1917.

Les profils de colonisation pulmonaire et nasal des souris IL17<sup>-/-</sup>, infectées avec 10<sup>5</sup> CFU B1917, ont été comparés avec ceux obtenus pour les souris C57BL/6 infectées avec la même dose (**Fig.39**).

La colonisation pulmonaire des souris KO naïves ou vaccinées avec aP ou wP étaient similaires à celles des WT correspondants (**Fig.39A**). Toutefois, les souris KO vaccinées avec wP éliminaient plus rapidement et de façon significative, les bactéries que les souris vaccinées avec aP. A l'inverse, dans la cavité nasale, les souris KO naïves ne parvenaient plus à éliminer l'infection à d56 et les souris KO vaccinées étaient colonisées davantage que les souris WT (**Fig.39B**). Ces résultats indiquent que l'IL17 n'est donc pas nécessaire dans le contrôle de l'infection dans les poumons de souris naïves ou vaccinées mais qu'elle semble moduler la protection contre la colonisation de la cavité nasale.

Comme l'IL17 est impliquée dans l'expression du pIgR, les profils de colonisation pulmonaire et nasale des souris pIgR<sup>-/-</sup>, infectées avec 10<sup>6</sup> CFU B1917, ont été comparés avec ceux obtenus pour les souris C57BL/6 infectées avec la même dose correspondante (**Fig.40**).

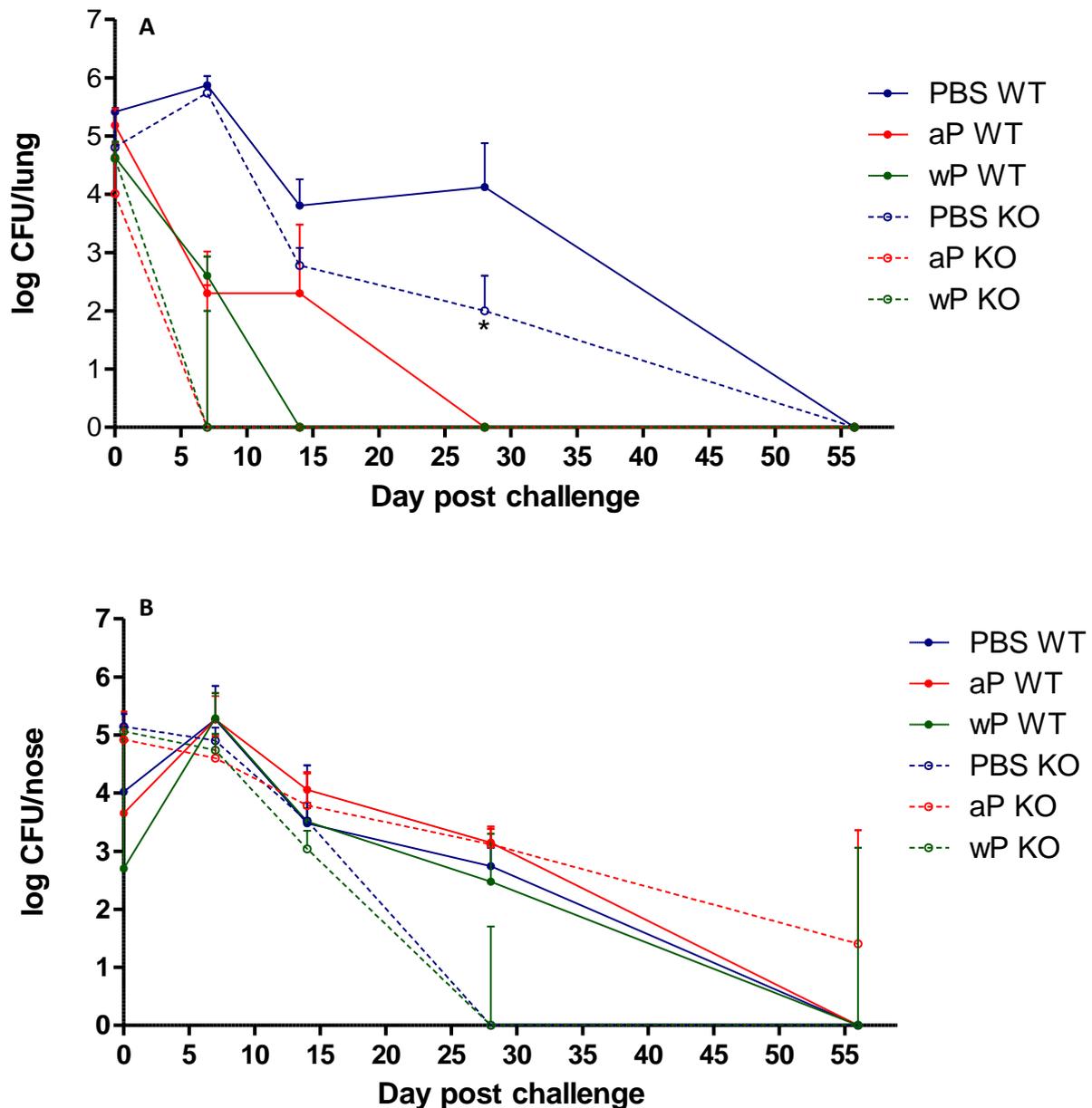
La cinétique de colonisation pulmonaire des souris naïves pIgR<sup>-/-</sup> présentait un pic d'infection à d7 et une clairance complète à d56, comme les souris sauvages, néanmoins nous avons constaté une réduction significative du nombre de bactéries chez les souris KO à d28 (**Fig.40A**). Les souris KO vaccinées avec aP ou wP éliminaient l'infection plus rapidement que les souris WT, dès d7. Dans le nez, l'élimination des bactéries n'était pas différente entre souris KO et WT, alors que les souris KO vaccinées avec aP éliminaient les bactéries dès d28 contre d56 pour les souris WT



**Figure 39:** Cinétiques de colonisation de souris *Il17<sup>-/-</sup>*. Les souris ont été vaccinées, par voie sous-cutanée, 2 fois à 4 semaines d'intervalle avec  $1/10^{\text{ème}}$  de la dose humaine d'Infanrix® hexa (aP-courbe rouge) ou Shan5® (wP-courbe verte) ou n'ont pas été vaccinées (PBS-courbe bleue). Les souris *Il17<sup>-/-</sup>* (KO-courbe pointillé) ont été infectées 4 semaines après la 2<sup>ème</sup> de dose de vaccin avec  $10^5$  CFU B1917. Les courbes de colonisation sont comparées avec celles obtenues pour les C57BL/6 (WT-trait plein). Les colonisations pulmonaires (A) et nasale (B) ont été évaluées à 3h (d0), 1 semaine (d7), 2 semaines (d14), 4 semaines (d28) et 8 semaines (d56) après infection. Chaque point de cinétique et chaque groupe de souris sont représentés par la médiane avec l'interquartile de n=5 souris. Les statistiques sont réalisées avec un test Mann-Whitney, avec \*\*\*  $p < 0.005$ .

(**Fig.40A**). Ces résultats indiquent que l'expression du PlgR n'est pas nécessaire au contrôle d'une colonisation pulmonaire lors d'une infection naturelle et que ce défaut d'expression est contrebalancé par un meilleur contrôle de l'infection chez des souris immunisées avec aP ou wP. Enfin, il semble que l'expression du PlgR ne soit pas impliquée dans le contrôle de l'infection nasale pour des souris vaccinées avec aP, alors que son absence semble diminuer le temps de colonisation pour les souris non-vaccinées et les souris vaccinées avec wP.

Comme le mécanisme de protection nasale contre une infection chez des souris naïves ou immunisées dépend de l'IL17 mais pas du PlgR, il semble que les acteurs majeurs liés à la protection contre la colonisation nasale soient essentiellement cellulaires. Toutefois, nous avons montré précédemment que le transfert passif, par voie intrapéritonéale, de sérum hyperimmun aP induisait un certain niveau de protection dans le nez. C'est pourquoi, nous avons analysé la réponse anticorps induite lors de ces expériences de colonisations.



**Figure 40:** Cinétiques de colonisation de souris  $plgR^{-/-}$ . Les souris ont été vaccinées, par voie sous-cutanée, 2 fois à 4 semaines d'intervalle avec  $1/10^{\text{ème}}$  de la dose humaine d'Infanrix® hexa (aP-courbe rouge) ou Shan5® (wP-courbe verte) ou n'ont pas été vaccinées (PBS-courbe bleue). Les souris  $plgR^{-/-}$  (KO-courbe pointillé) ont été infectées 4 semaines après la 2ème dose de vaccin avec  $10^6$  CFU B1917. Les courbes de colonisation sont comparées avec celles obtenues pour les C57BL/6 (WT-trait plein). La colonisation pulmonaire (A) et nasale (B) a été évaluée à 3h (d0), 1 semaine (d7), 2 semaines (d14), 4 semaines (d28) et 8 semaines (d56) après infection. Chaque point de cinétique et chaque groupe de souris sont représentés par la médiane avec l'interquartile de  $n=5$  souris. Les statistiques sont réalisées avec un test Mann-Whitney, avec \*  $p < 0.05$ .

## 2. Etude de la réponse anticorps

Le travail présenté dans cette partie est très préliminaire.

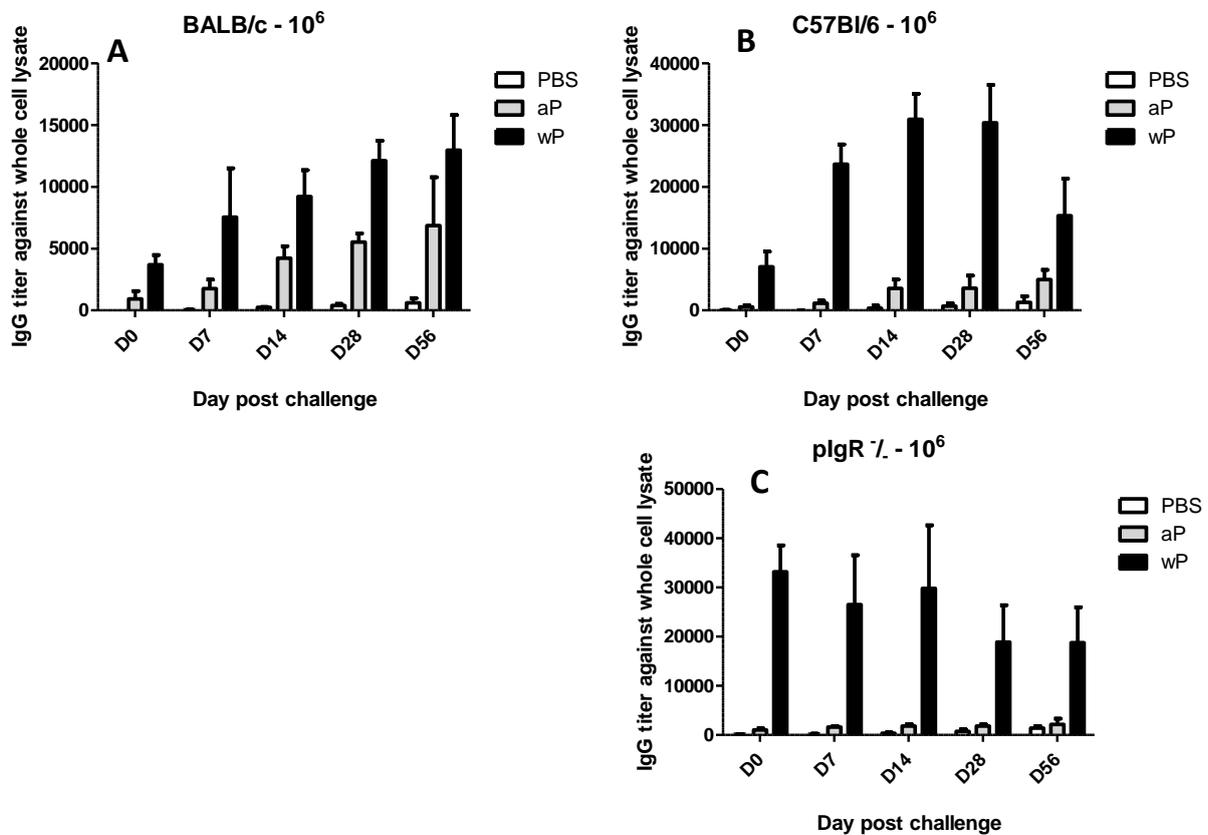
Dans un premier temps, nous avons quantifié la réponse sérique en IgG contre un lysat total par ELISA sur les échantillons de sang prélevés pendant la cinétique de colonisation des BALB/c, C57BL/6 et plgR<sup>-/-</sup> infectées à 10<sup>6</sup> CFU B1917 (**Fig.41**).

Chez les BALB/c, la réponse anticorps des souris naïves infectées était quantifiable dès 7 jours post-infection et augmentait jusqu'à d56. La production d'anticorps chez les souris vaccinées avec wP et aP et infectées augmente de d0 jusqu'à d56 (**Fig.41A**). Globalement, l'amplitude de la réponse anticorps induite par le vaccin aP était moindre que celle induite par la vaccination wP chez les souris BALB/c. De même pour les souris de fond génétique C57BL/6, l'amplitude de la réponse anticorps pour les souris vaccinées wP était près de 10 fois supérieure à celle des souris vaccinées avec aP (**Fig.41B**). La production d'anticorps chez les souris naïves infectées était croissante avec le temps. Cette différence d'amplitude dans la réponse anticorps peut s'expliquer par le fond génétique des souris, BALB/c pro-Th2 et C57BL/6, pro-Th1, et par le profil immunitaire induit par les vaccins, aP pro-Th2 et wP pro-Th1. Chez les souris plgR<sup>-/-</sup>, la réponse anticorps ne variait pas entre d0 et d56 pour les souris des groupes aP et wP, alors que la réponse des souris naïves augmentait avec le temps. La différence d'amplitude entre les groupes aP et wP était toujours observée (**Fig.41C**). Il semble que le défaut d'expression du plgR induise une saturation des IgG dans le sang des souris vaccinées aP et wP. En effet, le défaut d'expression du plgR chez la souris montre une augmentation des taux d'IgG et d'IgA dans le sang et le plgR est essentiel dans la sécrétion des anticorps sécrétoires au niveau des muqueuses<sup>270</sup>. La réponse sérique en IgA n'a pas encore été évaluée dans cette étude mais permettra de confirmer que les vaccins aP et wP n'induisent que peu d'IgA chez les BALB/c et C57BL/6 en raison du mode d'administration du vaccin.

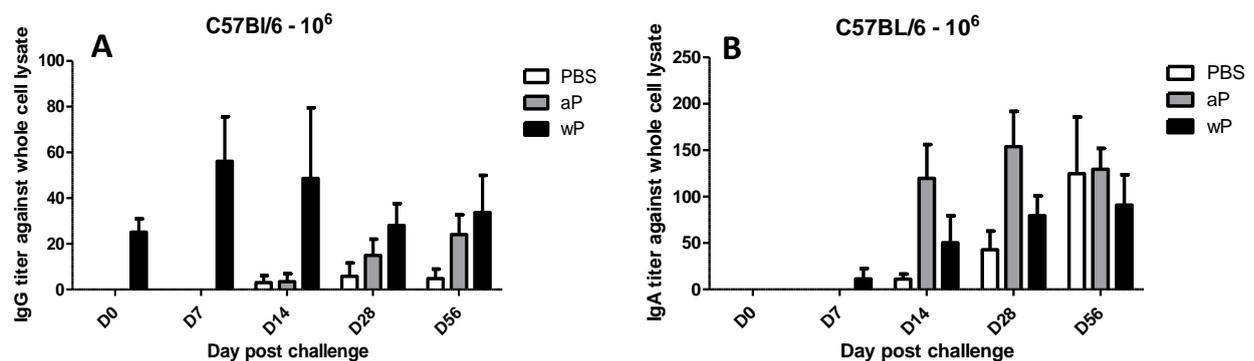
Dans un deuxième temps, nous avons quantifié par ELISA la réponse IgG et IgA dans les lavages de nez chez les souris C57BL/6 infectées avec 10<sup>6</sup> CFU B1917 (**Fig.42**).

Les souris vaccinées avec wP présentaient un taux muqueux d'IgG constant entre d0 et d56 alors qu'il semble être induit à d14 pour les souris vaccinées avec aP et pour les souris naïves après infection (**Fig.42A**). Ceci suggère une exudation des IgG sériques vers la cavité nasale pour les souris naïves et vaccinées avec aP suite à l'infection. Alors que les souris vaccinées wP sembleraient avoir acquis anticorps suite à la vaccination. De même, l'apparition d'IgA dans le mucus nasal des souris naïves et aP à d14 et wP à d7 montre une sécrétion médiée par l'infection (**Fig.42B**). La comparaison des réponses IgG et IgA dans le sang et dans le lavage

nasal permettra d'évaluer l'importance de la transsudation des anticorps sériques vers les muqueuses.



**Figure 41:** Cinétique de la réponse IgG sérique contre un lysat total de *B. pertussis* chez des souris (A) BALB/c, (B) C57BL/6 et (C) plgR<sup>-/-</sup> infectées avec 10<sup>6</sup> CFU B1917. Les souris sont naïves (PBS-blanc), vaccinées avec Infanrix® hexa (aP-gris) ou Shan5® (wP-noir) avant d'être infectées puis sacrifiées à 3h (d0), 1 semaine (d7), 2 semaines (d14), 4 semaines (d28) et 8 semaines (d56) après infection. Pour chaque temps et groupe de souris n=5.



**Figure 42:** Cinétique de la réponse anticorps dans les lavages de nez des souris C57BL/6 infectées avec 10<sup>6</sup> CFU B1917. Titration des IgG (A) et des IgA (B) contre un lysat total de *B. pertussis*. Les souris sont naïves (PBS-blanc), vaccinées avec Infanrix® hexa (aP-gris) ou Shan5® (wP-noir) avant d'être infectées puis sacrifiées à 3h (d0), 1 semaine (d7), 2 semaines (d14), 4 semaines (d28) et 8 semaines (d56) après infection. Pour chaque temps et groupe de souris n=5.

## D. Bilan sur le rôle des anticorps dans les contextes d'immunisation passive et active

Nous avons pu montrer lors d'expériences de transfert, par voie intrapéritonéale, de sérums issus de souris vaccinées avec aP ou wP, le rôle protecteur des anticorps sériques IgG et/ou IgA contre la colonisation pulmonaire de *B. pertussis*. Nous avons également montré que cette protection pouvait s'étendre, dans une moindre mesure, à la cavité nasale pour les souris ayant reçu du sérum aP. Nous n'avons pas pu conclure sur l'activité inhibitrice des anticorps transférés.

Les expériences d'immunisation par vaccination de souris présentant des fonds génétiques différents ont permis de montrer des profils de colonisation distincts entre C57BL/6 et BALB/c suivant une infection intranasale. La dose d'infection joue également un rôle dans l'induction de la réponse immunitaire, puisque nous avons montré un effet dose-réponse dans la colonisation pulmonaire des souris vaccinées, autrement-dit à  $10^5$  CFU B1917 la clairance était plus rapide qu'à  $10^6$ . Néanmoins, cette dose-réponse était différente pour la colonisation nasale, puisqu'à plus faible dose, la clairance était retardée chez les souris vaccinées. De plus, la vaccination avec aP protégeait contre la colonisation pulmonaire mais pas contre la colonisation nasale des BALB/c quelle que soit la dose, contrairement aux C57BL/6. L'utilisation de souris *plgR*<sup>-/-</sup> montre que l'expression de ce récepteur ne semble pas être essentielle à la protection nasale et pulmonaire alors que l'IL17 a montré l'importance de cette cytokine pour le contrôle de l'infection nasale. En parallèle, la caractérisation de la réponse humorale sérique et mucoale par ELISA et par BGIA permettrait éventuellement d'établir un lien entre la fonctionnalité des anticorps induits suite à une vaccination avec aP ou une vaccination avec wP et la protection dans la muqueuse nasale ou pulmonaire.

## **VIII. Etude de la réponse anticorps dans le modèle babouin**

Une analyse mathématique de l'incidence de la coqueluche dans des pays utilisant le vaccin acellulaire a montré que la résurgence de la coqueluche était essentiellement attribuée à la circulation asymptomatique du pathogène<sup>274</sup>. L'utilisation récente du modèle babouin<sup>163</sup> comme modèle animal relevant pour l'étude de la colonisation et de la transmission de la coqueluche<sup>275</sup>, a permis de montrer que le vaccin acellulaire (1) protégeait contre la maladie (toux, leucocytose) mais pas contre la colonisation bactérienne et (2) permettait la transmission du pathogène à des babouins naïfs<sup>25</sup>.

Le laboratoire d'accueil a développé une souche vaccinale vivante et atténuée, BPZE1, administrée par voie intranasale<sup>29</sup> et capable de coloniser transitoirement le tractus respiratoire sans effets délétères<sup>49</sup> afin d'induire une immunité mucoale protectrice de longue durée<sup>276</sup> au site d'infection et de colonisation<sup>277</sup>.

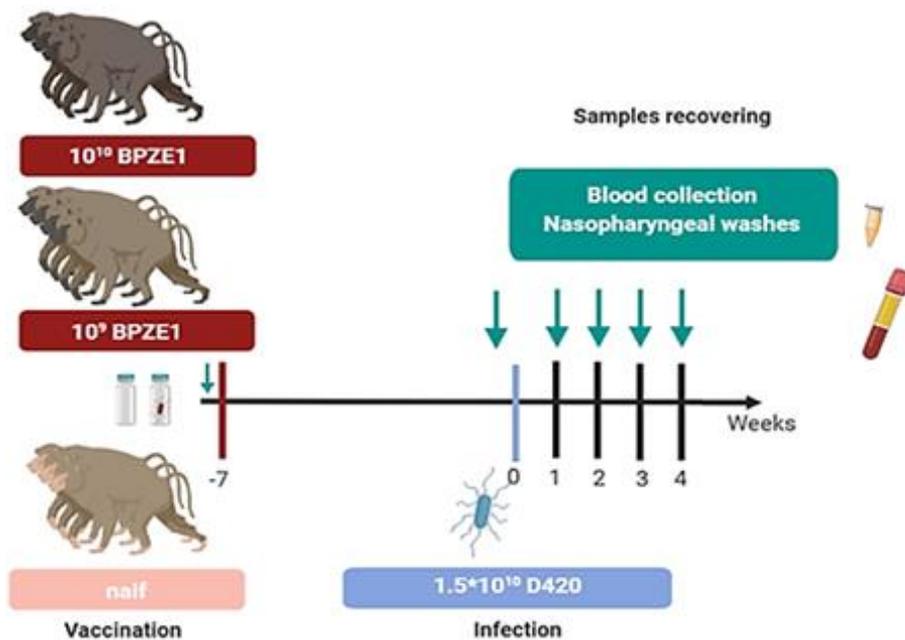
Dans le modèle babouin, l'utilisation du candidat vaccin BPZE1 a montré une protection contre la colonisation d'une souche clinique à pouvoir pathogène élevé et une induction d'anticorps IgG et IgA sériques spécifiques à *B. pertussis*<sup>52</sup>. Afin de caractériser d'avantage cette réponse anticorps sérique, l'activité inhibitrice a été évaluée en BGIA et corrélée avec les titres anticorps déterminés précédemment.

### **A. Etude de la fonctionnalité des anticorps induits vaccination à BPZE1**

#### **1. Matériel et méthodes**

*Vaccination et infection (réalisées au Centre des Sciences de la Santé de l'Université d'Oklahoma, USA)*

Cette partie du protocole n'a pas été réalisée au laboratoire d'accueil mais il est résumé en partie ici pour une meilleure compréhension de l'expérience (d'après Loch et al., 2017). Dans cette publication figure les résultats de colonisation (non discutés dans ce chapitre) et les titres ELISA dont il est fait référence et dont les données brutes ont servi dans cette partie (**Fig.43**).



**Figure 43:** Protocole et ligne de temps de vaccination, d'infection et de prélèvement des échantillons biologiques des babouins. 3 babouins ont été vaccinés avec  $10^{10}$  CFU BPZE1, 4 babouins avec  $10^9$  CFU BPZE1 et 3 babouins naïfs ont été utilisés pour cette expérience. 7 semaines après l'administration du vaccin ou du tampon control, les 10 babouins ont été infectés avec  $1.5 \times 10^{10}$  bactéries de la souche virulente D420. Chaque semaine post-infection, soit aux semaines 1 à 4, des lavages nasopharyngés et des prélèvements de sang ont été réalisés sur les babouins. Des échantillons de sang ont également été prélevés juste avant la vaccination, échantillons pré-immuns avant le point -7 semaine, et l'infection, échantillons pré-challenges avant le point 0.

### *Manipulation des sérums babouins*

L'expérimentation sur les babouins a été réalisée au Centre des Sciences de la Santé de l'Université d'Oklahoma, USA. Les séras de babouins, importés dans notre laboratoire, ont été aliquotés et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les séras ont été utilisés sans traitement préalable ou décomplémentés par chauffage à  $56^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min.

### *BGIA*

10  $\mu\text{l}$  de bactéries, BPSM, à la concentration initiale de  $2 \cdot 10^6$  CFU/ml ont été ajoutés dans chaque puit de la microplaque blanche 96 demi-puits (Greiner, 675075). Y a été ajouté 10  $\mu\text{l}$  du sérum babouin non décomplémenté ou décomplémenté dans les puits tests. Des puits contrôles remplis de bactéries uniquement ont servi à normaliser les résultats. Les séras ont été dilués du  $1/2^{\text{ème}}$  au  $1/256^{\text{ème}}$ . La plaque recouverte d'un couvercle en plastique (Greiner, 656190) a été centrifugée à  $10 \times g$  pendant 1 min puis incubée sans agitation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 4h. Après incubation, 20  $\mu\text{l}$  de BacTiter-Glo (Promega, G8230) ont été ajoutés pour chaque puits, puis incubés pendant 10 min à température ambiante sur un agitateur de plaques orbitales. Après cette incubation, le signal de luminescence a été lu avec un luminomètre (Berthold Centro XS<sup>3</sup> LB 960) avec les paramètres suivants : 5 min de délai par plaque et un temps de comptage de 0,1 seconde par puit.

## Analyse

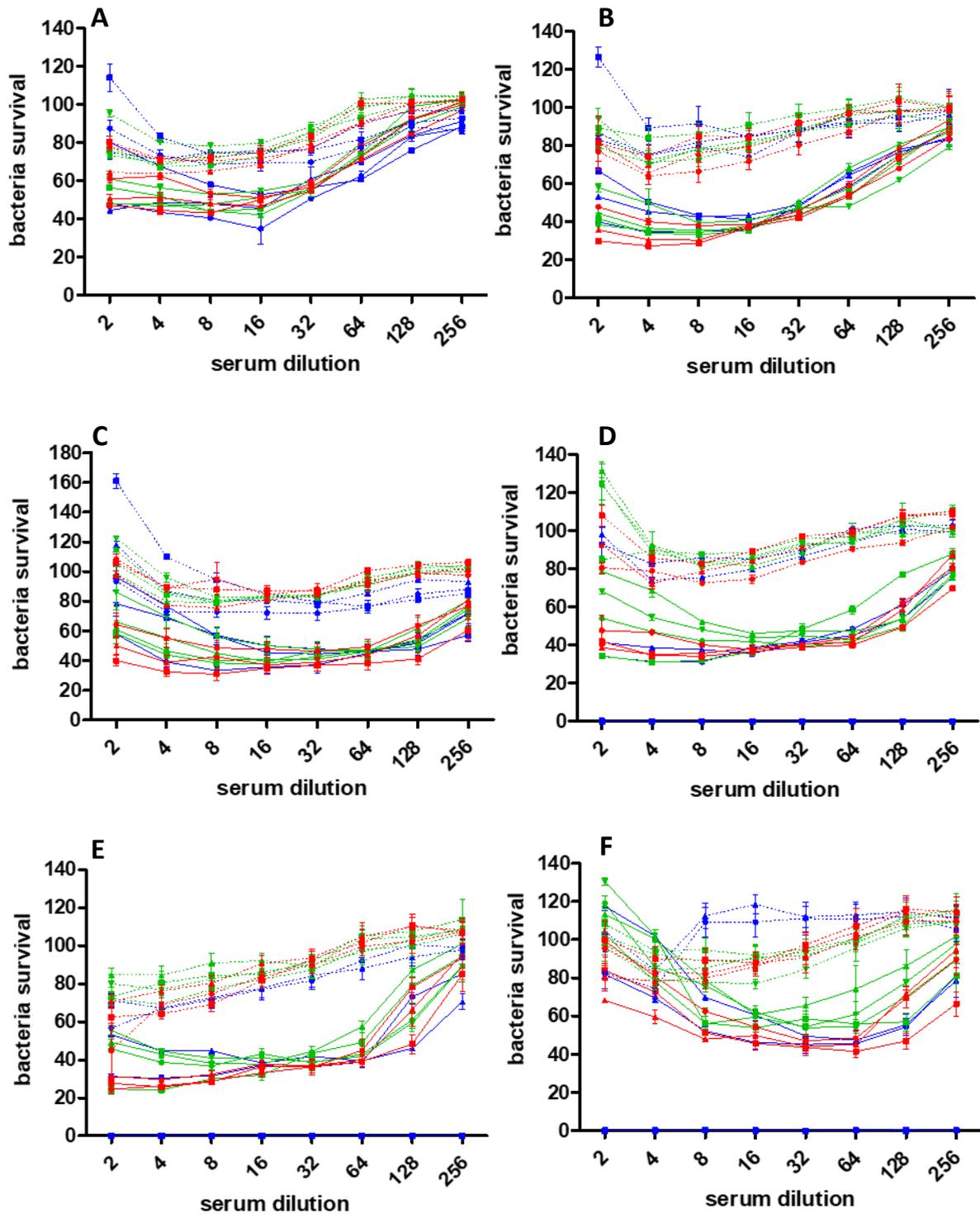
Cf la partie « Materials and Methods », sous-partie « Analyses » dans la section V. A.

### 2. Analyse des échantillons par BGIA

Dans un premier temps, l'activité inhibitrice des anticorps a été évaluée en BGIA avec l'objectif de montrer une éventuelle induction d'anticorps bactéricides ou bactériostatiques suite à une vaccination avec le candidat vaccin BPZE1. Cette induction vaccinale sera comparée avec celle induite lors d'une infection naturelle dans le modèle babouin. Pour ce faire, nous avons appliqué le BGIA sur les échantillons de sérums non traités et traités pour la décomplémentation afin d'évaluer l'activité inhibitrice anticorps-dépendante médiée ou non par le complément.

L'activité effectrice de la réponse humorale sérique avant administration de  $10^9$  ou  $10^{10}$  CFU BPZE1 ou PBS, est représentée en **figure 44A** (point de la cinétique -7 semaines) et celle d'avant infection (point 0 semaine), avec une forte dose de la souche virulente D420<sup>163,278</sup>, est représentée en **figure 44B** pour les 3 groupes de babouins. Cette activité est suivie au cours du temps, soit toutes les semaines pendant 4 semaines : 1 semaine post-challenge en **figure 44C**, 2 semaines post-challenge en **figure 44D**, 3 semaines post-challenge en **figure 44E** et 4 semaines post-challenge en **figure 44F**.

Globalement, l'activité des sérums décomplémentés, représentée par des lignes en pointillés, est moins inhibitrice que l'activité des sérums non traités, représentée en ligne continue. Le profil de courbe d'inhibition du sérum non traité est semblable pour les 3 groupes de babouins et pour les différents temps de la cinétique de prélèvement sanguin. C'est-à-dire que les courbes dose-réponse donnent une allure de parabole inversée, pour lesquelles on peut déterminer des points remarquables comme l'infléchissement qui représentent le maximum d'inhibition. Ce point se situait à la dilution  $1/4^{\text{ème}}$  pour la plupart des courbes de sérum décomplémentés, pour les différents temps et différents groupes à l'exception du point 3 semaines post-challenge pour les 3 groupes de babouins (**Fig.44E**). A ce temps, l'inhibition maximum se situait entre 10 et 30% pour le groupe  $10^9$  contre 30 et 60% pour les groupes  $10^{10}$  et naïf à la dilution  $1/2$

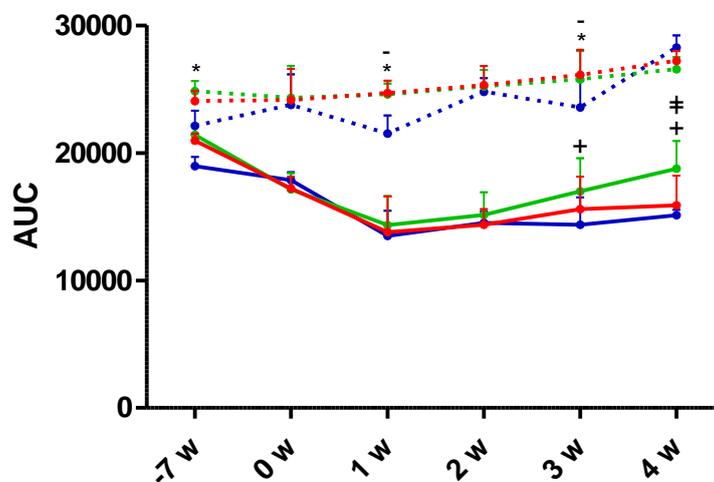


**Figure 44:** Courbes représentatives des tests BGIA effectués sur les échantillons de séra de babouins. Le BGIA a été réalisé sur les séra non traités (courbe en trait plein) et sur séra décomplémentés (courbe en pointillé) dilué en série du 1/2 jusqu'au 1/256. Les babouins naïfs sont représentés par des points bleus, les babouins ayant été vaccinés avec  $10^9$  CFU BPZE1 par des points verts et les babouins vaccinés avec  $10^{10}$  CFU BPZE1 par des points rouges. Chaque babouin correspond à un symbole différent. Les différents points de cinétique de prélèvements sanguins dont les pré-immuns (A), les pré-challenge (B), 1 semaine (C), 2 semaines (D), 3 semaines (E) et 4 semaines (F) post-infection sont représentés sur le graphique correspondant. Un babouin naïf est mort entre la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine post infection. Ces graphiques représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes.

Concernant les séra non traités, ce point d'infléchissement était plus variable en fonction du temps et du groupe de babouins. Pour les courbes issues des échantillons de pré-vaccination -7 semaines (**Fig.44A**) et de pré-challenge 0 semaine (**Fig.44B**), la dilution pour laquelle le maximum d'inhibition de croissance était atteinte était de  $1/16^{\text{ème}}$  pour les 3 groupes de babouins, correspondant respectivement à un taux de survie globale de 40 à 60% et 35 à 45%. De plus, la dilution maximale de sérum induisait un taux de survie compris entre 80 et 100%. Après 1 semaine (**Fig.44C**) et 2 semaines (**Fig.44D**) de challenge, le maximum d'inhibition était compris entre les dilutions  $1/16^{\text{ème}}$  et  $1/32^{\text{ème}}$ , ce qui correspond à environ 40-60% et 40-50% de survie, respectivement. Ces séra induisaient entre 60-80% d'inhibition à la dilution de sérum la plus élevée. 3 semaines après le challenge (**Fig.44E**), les séra issus du groupe de babouins vaccinés avec  $10^{10}$  CFU BPZE1 ainsi qu'un babouin du groupe naïf et un autre du groupe  $10^9$ , étaient très inhibiteurs, soit 20-30% de survie à la dilution  $1/2^{\text{ème}}$ . Alors qu'un second babouin naïf et les autres babouins du groupe  $10^9$  donnaient un sérum dont les dilutions comprises entre  $1/16^{\text{ème}}$  et  $1/32^{\text{ème}}$  concordent avec 40 à 50% de survie. Enfin à 4 semaines post-challenge (**Fig.44F**), les babouins des groupes naïfs et  $10^{10}$  indiquaient une inhibition maximale de croissance bactérienne à la dilution  $1/64^{\text{ème}}$ , soit 40-50% de survie, alors que les babouins du groupe  $10^9$  montraient une inhibition maximale entre les dilutions  $1/16^{\text{ème}}$  et  $1/32^{\text{ème}}$ , soit 50 à 70% de survie. Lors des 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> semaines post-infection, la dilution maximale de sérum entraînait un taux de survie des bactéries correspondant à 70-100%. Ces résultats montrent que la dilution correspondant au point d'infléchissement augmente dans le temps et atteint un maximum à la 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> semaine post-challenge, autrement dit, la capacité des sérums à induire une inhibition de croissance de *B. pertussis* est optimale après 3 à 4 semaines post-infection.

En amont du point d'infléchissement, l'activité inhibitrice du sérum était plus faible, malgré la forte concentration en sérum, donnant l'aspect de parabole aux courbes. Ce phénomène avait déjà été observé il y a plus de 50 ans<sup>250,279</sup> comme étant directement lié à la composition du sérum qui présenterait un excès d'anticorps et/ou de complément, induisant par ce fait une agglutination de ces derniers et donc une inhibition de bactéricidie. Ce phénomène de prozone, également appelé Neisser-Wechsberg, est d'autant plus observé sur le sérum non chauffé<sup>280</sup>. L'existence d'éléments présents dans le sérum de babouin pourrait également avoir des effets favorisant la croissance de *B. pertussis* et pourrait par synergie, avec l'excès de complément ou d'anticorps, être à l'origine de cette diminution d'inhibition.

Afin de mieux visualiser les effets inhibiteurs des séra sur la croissance de *B. pertussis* et comme les courbes doses-réponses ne se présentent pas en forme sigmoïde, nous avons calculés les aires sous la courbe (**Fig.45**) plutôt que les ID<sub>50</sub>. Les AUC correspondent aux résultats de BGIA exprimés en survie bactérienne en fonction de la gamme de dilution des sérums, et ont été calculées pour chaque réplica afin de représenter la moyenne et l'écart standard. On constate qu'il n'existait pas de différence entre l'activité inhibitrice des sérums décomplémentés issus des babouins vaccinés avec 10<sup>9</sup> ou 10<sup>10</sup> CFU BPZE1. Néanmoins, il y avait une différence significative entre le groupe naïf et les groupes 10<sup>9</sup> et 10<sup>10</sup> à 1 et 3 semaines post-challenge et entre les groupes naïf et 10<sup>9</sup> avant vaccination. En outre, les séra non traités étaient statistiquement plus inhibiteurs que les sérums traités, et on constate une différence statistique entre les groupes naïf et 10<sup>9</sup> à 3 et 4 semaines post-infection. Ces sera non traités étaient aussi plus efficaces lorsqu'ils étaient issus des babouins vaccinés à 10<sup>10</sup> BPZE1 qu'à 10<sup>9</sup> à 4 semaines après infection. Ces résultats indiquent que dès 3 semaines après le challenge des babouins avec la souche virulente, le sérum des groupes naïfs et vaccinés avec 10<sup>10</sup> CFU BPZE1 semblaient être plus inhibiteurs que le groupe de babouins vaccinés avec 10<sup>9</sup> CFU BPZE1.

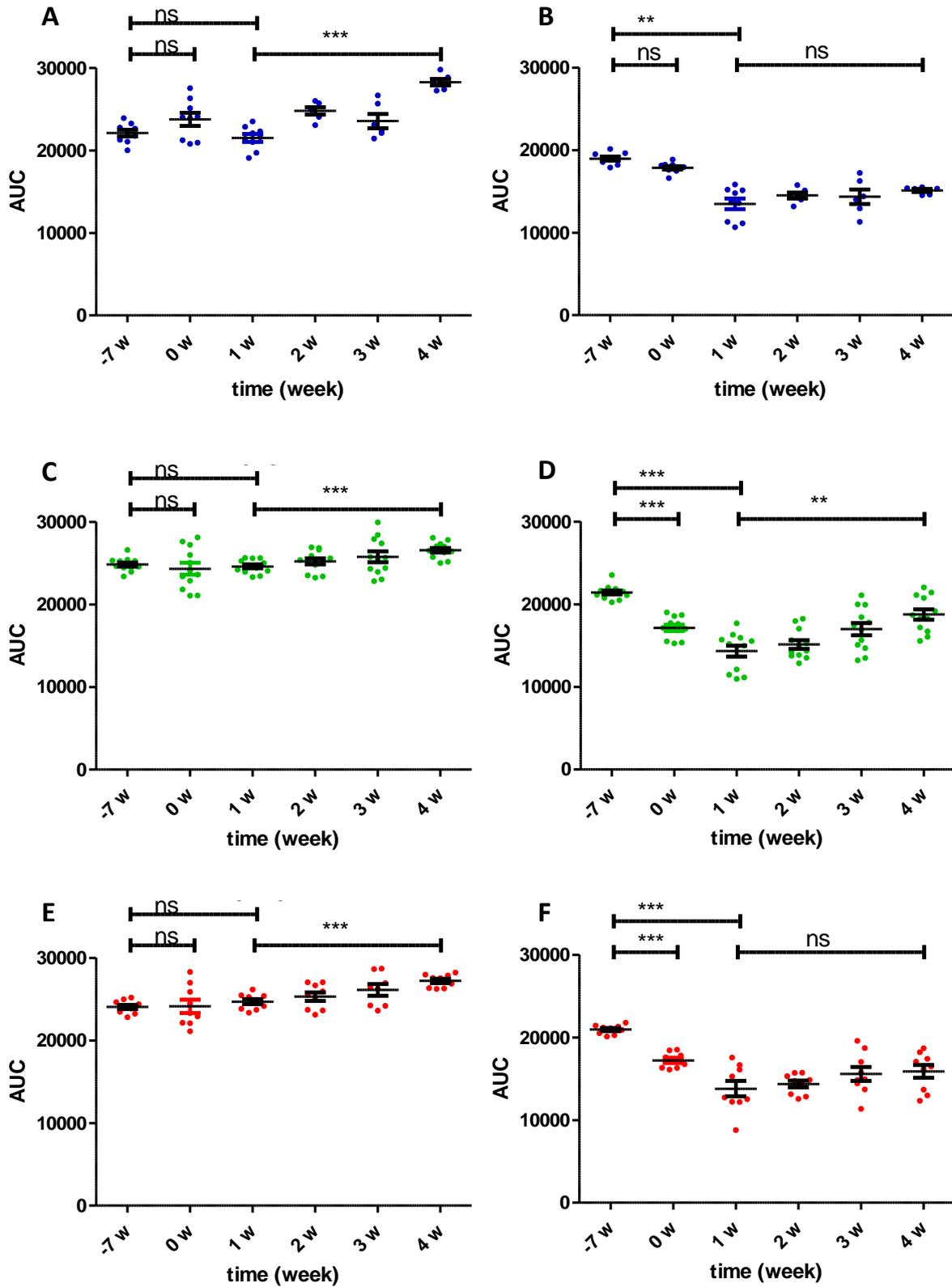


**Figure 45:** Représentation des aires sous la courbe (AUC) des courbes doses-réponses au sérum mesurées en BGIA en fonction du moment de prélèvements de sang sur les babouins. Les courbes d'inhibition de croissance de *B. pertussis* ont été obtenues après 4h d'incubation avec les sérums non traités, représentés en ligne pleine, ou avec les sérums décomplémentés, représentés en ligne pointillée. Les points bleus définissent les babouins naïfs, les points verts sont les babouins vaccinés avec 10<sup>9</sup> CFU BPZE1 et les points rouges sont les babouins vaccinés avec 10<sup>10</sup> CFU BPZE1. Le graphe représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les statistiques sont effectués avec un test 2-way ANOVA pour mesure répétée avec un post-test de Bonferroni. Pour les courbes avec les sérums décomplémentés : -7w (naïf vs 10<sup>9</sup>)\* : p<0.01 ; 1w (naïf vs 10<sup>9</sup>)- : p<0.01 ; 1w (naïf vs 10<sup>10</sup>)\* : p<0.01 ; 3w (naïf vs 10<sup>9</sup>)- : p<0.05 ; 3w (naïf vs 10<sup>10</sup>)\* : p<0.05. Pour les courbes avec les sérums non traités : 3w (naïf vs 10<sup>9</sup>)+ : p<0.05 ; 4w (naïf vs 10<sup>9</sup>)+ : p<0.001 ; 4w (10<sup>9</sup> vs 10<sup>10</sup>)‡ : p<0.01.

Par la suite, nous avons analysé plus précisément la réponse inhibitrice sur la croissance de *B. pertussis* suivant 3 paramètres : en fonction de chaque groupe de babouins, en fonction du temps et selon le sérum utilisé (**Fig.46**). Pour cela, les AUC calculées précédemment pour chaque réplica ont été individualisées en fonction de ces 3 paramètres.

L'activité des anticorps, indépendamment de l'activité du complément, issus des séra du groupe naïf ne variait pas entre le point -7 semaines et le pré-challenge, comme attendu, mais diminuait entre la 1<sup>ère</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine post-infection selon les AUC calculées (**Fig.46A**). D'autre part, l'activité anticorps dépendante de complément ne variait pas non plus entre -7 semaines et la pré-infection (0 semaine), mais était plus inhibitrice 1 semaine après l'infection jusqu'à la 4<sup>ème</sup> semaine post-infection (**Fig.46B**). Ces résultats sont surprenants dans la mesure où on aurait pu s'attendre à une augmentation de l'activité inhibitrice en fonction du temps révélatrice de l'augmentation d'anticorps à partir de 2 semaines post-infection. Cependant, il est à noter que le groupe naïf ne compte que 3 babouins jusqu'à la 8<sup>ème</sup> semaine, puis 2 jusqu'à la fin de l'expérience, rendant les statistiques peu pertinentes.

Concernant l'activité inhibitrice des anticorps présents dans le sérum décomplémenté des babouins appartenant aux groupes  $10^9$  (**Fig.46C**) et  $10^{10}$  (**Fig.46E**), on ne constate aucune différence significative entre la pré-vaccination et le pré-challenge ou 1 semaine post-challenge. Cependant, l'activité du sérum non chauffé sur l'inhibition de croissance des bactéries était augmentée de façon statistiquement significative après la vaccination (0 semaine) et le challenge (1 semaine) indiquant l'induction d'anticorps bactéricides et bactériostatiques suite à la vaccination BPZE1. On constate par ailleurs que cette activité diminuait au cours du temps pour le groupe de babouins  $10^9$  (**Fig.46D**) alors qu'elle ne variait pas de la 1<sup>ère</sup> à la 4<sup>ème</sup> semaine post-infection pour le groupe de babouins  $10^{10}$  (**Fig.46F**).

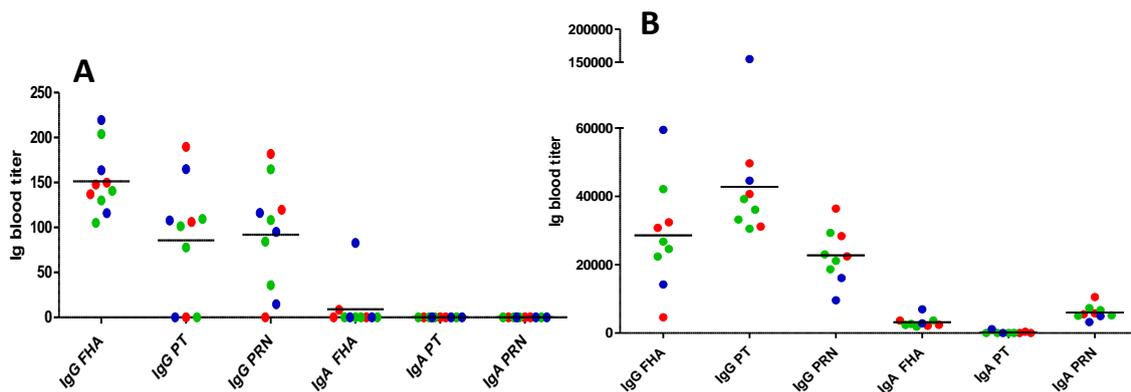


**Figure 46:** Analyse des aires sous la courbe (AUC) issues des dose-réponse obtenus en BGIA en fonction du temps et selon l'activité inhibitrice du sérum chauffé (A, C, E) et non-chauffé (B, D, F) pour les 3 groupes de babouins. Les babouins du groupe naïf (N=3) n'ayant pas été vaccinés sont représentés en bleu (A, B), du groupe ayant été vaccinés avec 10<sup>9</sup> CFU BPZE1 (N=4) en vert (C, D) et avec 10<sup>10</sup> CFU BPZE1 (N=3) en rouge (E, F). Les graphiques représentent des tripliquas d'expériences indépendantes. Les statistiques sont réalisées avec un test Mann-Whitney, avec \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

### 3. Résumé sur l'activité BGIA

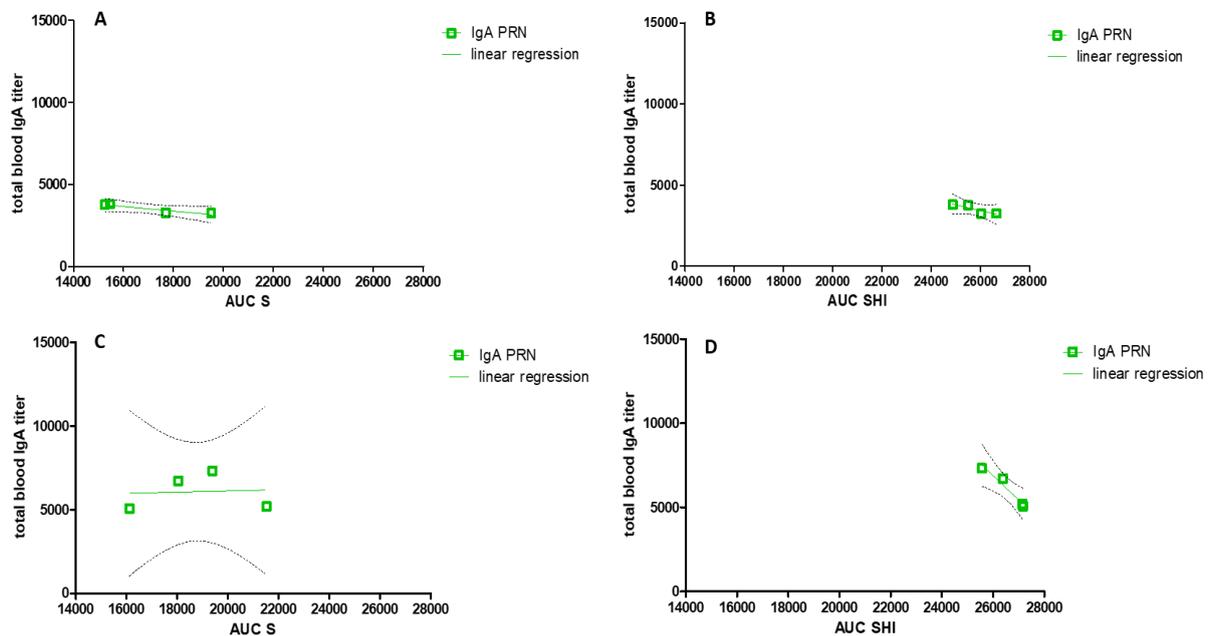
Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'activité inhibitrice d'anticorps non-médiée par le complément suivait la même tendance de perte d'activité dans le temps entre les groupes de babouins non-vaccinés et vaccinés. Dans un premier temps, il semblerait que les échantillons de sérums naïfs étaient plus inhibiteurs à -7 semaine, 1 semaine et 3 semaines. Le dosage anticorps sur les séra pré-vaccination de babouins naïfs ont montré que 2 babouins avaient plus d'IgG anti-FHA, anti-PT et anti-PRN et plus d'IgA anti-FHA, pour 1 babouin, que la moyenne obtenue sur les 10 babouins de l'expérience (**Fig.47A**). De même, après 3 semaines d'infection (**Fig.47B**), 1 babouin sur les 2 représentant du groupe naïf montrait un haut taux d'IgG et IgA anti-FHA et IgG anti-PT. Néanmoins, ces résultats ne sont probablement pas significatifs en raison du faible nombre de babouins naïfs utilisés pour cette expérience. Dans un deuxième temps, l'activité inhibitrice des sérums décomplémentés décroît entre la 1<sup>ère</sup> et la dernière semaine de suivi pour les 3 groupes. En comparant l'activité du sérum non décomplémenté avec l'activité du sérum décomplémenté, on constate que l'activité inhibitrice liée au complément est observable à la 4<sup>ème</sup> semaine post-infection chez les babouins naïfs, alors que cette activité est observée à 1 et 2 semaines post-infection pour les babouins vaccinés.

Ensuite, l'étude de la réponse anticorps sur sérum non traité a permis de montrer que la vaccination BPZE1 induisait des anticorps inhibiteurs de croissance bactérienne dépendants de complément. La vaccination de babouins avec  $10^{10}$  CFU BPZE1 induisait une activité inhibitrice de la croissance bactérienne prolongée dans le temps. Nous n'avons constaté aucune baisse d'inhibition à 4 semaines post-challenge. Cette activité était plus importante que celle induite par la vaccination avec  $10^9$  CFU BPZE1. De plus, il était surprenant de constater une forte activité précoce des sérums de babouins issus du groupe naïf, sachant que le pic d'anticorps est estimé à 4 semaines post-infection. Nous avons constaté tout de même une augmentation globale des IgG et IgA anti-FHA, anti-PT et anti-PRN dès la 2<sup>ème</sup> semaine post-infection. On peut penser que les anticorps précocement induits après une infection à *B. pertussis* ont une activité inhibitrice semblable aux anticorps induits après challenge suite à une vaccination à BPZE1. Néanmoins, il est raisonnable de penser que d'autres mécanismes de défense appartenant au système humoral inné sont stimulés chez les babouins naïfs dans les premiers instants suivant l'infection avant que la réponse humorale ne soit amorcée. Des molécules inhibitrices présentes dans le sérum des babouins telles que les protéines de phase aigues, les protéines du système de coagulation, les peptides antimicrobiens et les anticorps naturels<sup>281</sup> pourraient être à l'origine de cette inhibition de croissance des bactéries. Mais il reste difficile de conclure sur le groupe naïf qui ne compte que de 2 individus dès la fin de la 1<sup>ère</sup> semaine post-infection.



**Figure 47:** Titres des anticorps IgG et IgA dirigés contre l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), la toxine pertussique (PT) et la pertactine (PRN), présents dans le sang des babouins avant la vaccination (A) et 3 semaines après infection (B). Les 3 babouins du groupe naïfs sont représentés par des points bleus, les 4 babouins du groupe 10<sup>9</sup> en vert et les 3 babouins du groupe 10<sup>10</sup> en rouge. Source : d'après Loch et al., 2017.

## B. Relation entre les effets inhibiteurs du sérum et les différents isotypes d'anticorps présents



**Figure 48:** Corrélations des titres anticorps IgA anti-PRN (présentés dans Loch et al., 2017) en fonction des aires sous la courbe (AUC) calculées en BGIA à partir des courbes doses-réponses de sérums non traité (noté S) ou décomplémenté (noté SHI). Les graphes représentent la corrélation du titre IgA sérique avec les AUC des BGIA sur sérum (A) et sérum décomplémenté (B) 3 semaines post-infection et sur sérum (C) et sérum décomplémenté (D) 4 semaines post-infection sur les 4 babouins vaccinés avec 10<sup>9</sup> CFU BPZE1. La droite de régression linéaire est indiquée sur chaque graphe avec la représentation en pointillée de l'intervalle de confiance à 95%. Pour (A)  $r^2=0.87$ , pour (B)  $r^2=0.79$ , pour (C)  $r^2=0.01$  et pour (D)  $r^2=0.95$ .

Les résultats de titration ELISA pour les IgG et IgA sériques antigènes-spécifiques proviennent de résultats publiés dans Loch et al., 2017<sup>52</sup>.

Etant donné que le groupe non-vacciné ne compte que 3 babouins en début d'expérience, puis 2 à la fin de la 2<sup>ème</sup> semaine post-infection, et que le groupe de babouins vaccinés avec 10<sup>10</sup> CFU BPZE1 compte 3 babouins, nous avons regardé la relation éventuelle entre les résultats obtenus en BGIA et les titres des différents d'anticorps pour le groupe de babouins vaccinés avec 10<sup>9</sup> CFU BPZE1 uniquement (**Fig.48**).

Aucune corrélation pour un coefficient de détermination  $r^2 > 0.7$  n'a pu être établie sur avec le taux sérique d'IgA et d'IgG pour les antigènes PT et FHA.

On constate qu'il existe un lien entre la quantité d'IgA sérique anti-PRN et l'activité inhibitrice des sérums issus de 3 (**Fig.48B**) et 4 (**Fig.48D**) semaines post-challenge. Dans la mesure où les IgA ne possèdent pas le domaine de fixation du C1q sur le fragment Fc, ils sont incapables d'induire une activation de la voie classique du complément. Ces résultats suggèrent que les IgA anti-PRN en forte concentration induisent une inhibition de la croissance de *B. pertussis* indépendante de complément. Il est possible que les IgA s'agglutinent et s'agrègent davantage sur *B. pertussis* lorsque la concentration en anticorps sérique augmente (**Fig.48A**), atteignent leur maximum à 3 semaines post-infection et diminution à 4 semaines. Il n'y avait pas de corrélation entre les titres IgA anti-PRN et les AUC des sérums non chauffés à 4 semaines (**Fig.48C**).

### C. Bilan de l'étude sur la fonctionnalité des anticorps sériques

L'étude de quelques échantillons de sérums babouins, par la technique de BGIA, a permis d'évaluer la fonctionnalité des anticorps induits dans un contexte de vaccination avec le candidat vaccin BPZE1.

La vaccination avec BPZE1 induisait rapidement des anticorps inhibiteurs, dépendant de l'activité du complément, sur la croissance de *B. pertussis*. L'effet inhibiteur était persistant 4 semaines après un challenge avec une souche virulente et semblait être dépendant de la dose initiale de vaccination.

De façon surprenante, cette fonction effectrice variait en fonction de la quantité d'anticorps IgA anti-PRN présent dans le sérum des babouins vaccinés 3 et 4 semaines après un challenge.

## **IX. Etude de la réponse anticorps dans le modèle humain**

L'étude de la réponse anticorps s'applique dans la majorité des études cliniques pour évaluer l'efficacité vaccinale des différents aP et wP par des dosages en ELISA. Néanmoins aucun corrélat de protection sur le dosage en anticorps permet de prédire une immunisation contre la coqueluche ou l'infection à *B. pertussis*. Nous nous sommes donc intéressés dans cette partie aux mécanismes effecteurs, et plus particulièrement à la fonctionnalité inhibitrice des anticorps.

### **A. Analyse sur un petit échantillon de sérums humains appariés avant et après un rappel vaccinal contre la coqueluche**

Dans le cadre d'un consortium européen pour la recherche d'un corrélat de protection contre la coqueluche « Periscope », nous avons obtenus des séra d'individus avant et après vaccination avec le vaccin acellulaire BoostrixTetra® (GlaxoSmithKline) ou Repevax® (Sanofi Pasteur). Nous avons réalisé une étude qualitative et quantitative de ces séra, comme expliquée ci-dessous. Ces vaccins sont composés de toxoïde diphtérique et tétanique, de virus poliomyélitique inactivé, ainsi que de 3 ou 4 antigènes majeurs de *B. pertussis* : toxoïde pertussique (8 µg), FHA (8 µg) et PRN (2.5 µg) pour le Boostrix® ou toxoïde pertussique (2.5 µg), FHA (5 µg), PRN (3 µg) et FIM (5 µg) pour le Repevax®. Dans cette étude sur échantillons humains, nous avons comparé les quantités d'anticorps produits contre différents antigènes de *B. pertussis* dans des séra avant et après vaccination avec l'activité BGIA de ces mêmes séra. Les tests ont été réalisés sur 6 échantillons (notés PHE1 à PHE6) appariés, c'est-à-dire, les échantillons PHE2 et PHE4 ont été prélevés sur un même individu 1 semaine avant et 1 semaine après vaccination avec le Boostrix®, respectivement. Il en est de même des échantillons PHE4 et PHE6. PHE5 et PHE3 proviennent d'un individu 1 semaine avant et 1 semaine après vaccination avec le Repevax®, respectivement.

#### **1. Matériel et méthodes**

##### *Lysat bactérien*

Après 36h de culture sur boîte BG avec streptomycine (à 100µg/ml) à 37°C, les bactéries BPSM ont été récoltées et resuspendues dans du milieu liquide SS avec antibiotique à la DO<sub>600nm</sub> finale 0.1. La culture liquide a été incubée à 37°C pendant 20h dans un agitateur rotatif à 200 rpm. Le bouillon de culture a été centrifugé à

$V_{max}$  pendant 15 min. Le surnageant a été jeté et le culot repris dans un tampon de lyse dont le volume permet d'obtenir une solution finale 25 fois concentrée. Ce dernier était constitué de tampon phosphate salin (PBS), de DN<sub>ase</sub> I (Sigma) à la concentration finale de 10 µg/ml et d'inhibiteurs de protéase (Roche) (1 pastille dissoute dans 25 ml d'eau pour une solution 25X). Le concentrat de bactéries a été dispersé dans des tubes de lyse à matrice B de 2 ml (MP biomedical) qui ont été placés dans un FastPrep-24 classique (MP biomedical). Le protocole de lyse était le suivant : 2 cycles à la vitesse 6 de 40 sec espacés de 2 min sur glace. Après la lyse, les tubes ont été centrifugés pour une clarification finale à  $V_{max}$  pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -20°C. Les protéines totales ont été dosées avec le kit BCA Pierce<sup>TM</sup> (Thermo).

### ELISA

Dans des plaque 96 puits (NUNC Maxisorp), de la FHA, PRN ou PT purifiées (provenant d'une collaboration avec les laboratoires Sanofi Pasteur) ou du lysat bactérien dilué dans du PBS ont été déposés à la concentration finale de 1 µg/puit. Cette étape de fixation de l'antigène a été réalisée à 4 °C sur la nuit. Ensuite les puits de la plaque ont été lavés 3 fois avec une solution de lavage constituée de PBS et de Tween-20 à la concentration finale de 0.1%. La plaque a été alors saturée en protéines aspécifiques avec la solution de lavage contenant en plus de la caséine à la concentration finale de 2% pendant 2h à température ambiante. Puis, le sérum dilué dans du PBS a été ajouté dans les puits tests en suivant une gamme de dilution au 1/2 alors que du PBS seul a été ajouté aux puits contrôles. Après incubation pendant 2h à 37°C, les puits ont été lavés 3 fois avec la solution de lavage avant d'ajouter un anticorps anti-IgG humain couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dilué au 1/4.000<sup>ème</sup> (Thermo, 31410). Enfin, les puits ont été lavés 5 fois avec la solution de lavage. La révélation s'est faite par ajout de 100µl de TMB (Thermo) et la réaction a été stoppée avant saturation du signal avec 50 µl d'acide phosphorique 10 mM. La plaque a été lue avec le lecteur de plaque (ELx800, BioTek) à 450nm. Les titres ELISA ont été calculés selon la formule suivante :

$$x = \frac{(\log_{10}(3 * \bar{x}_{DO(\text{puits contrôles})}) - (\text{ordonnée à l'origine} (dilution^{-1}; \log_{10}(DO(\text{puits tests}))))}{\text{pente} (dilution^{-1}; \log_{10}(DO(\text{puits tests})))}$$

Le calcul du coefficient de détermination  $r^2$  et la dispersion des mesures en nuage de point permettait de vérifier la qualité de l'ELISA.

### BGIA

10 µl de bactéries BPSM à la concentration initiale de  $2.10^7$  CFU/ml ont été ajoutés dans chaque puit de la microplaque blanche 96 demi-puits (Greiner, 675075). Y a été ajouté 10 µl du sérum humain non décomplémenté, décomplémenté ou recomplémenté dans les puits tests. La décomplémentation s'est faite à 56°C pendant 30 min. Le sérum humain déplété en IgG-IgM a été utilisé comme source

de complément pour la reconstitution. Des puits contrôles remplis de bactéries ou de complément uniquement ou d'antisérum standard (NIBSC, 06/140) ont servi à évaluer l'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne et à normaliser les résultats. Les séras sont dilués du 1/8<sup>ème</sup> au 1/1024<sup>ème</sup>. La plaque recouverte d'un couvercle en plastique (Greiner, 656190) a été centrifugée à 10 x *g* pendant 1 min puis incubée sans agitation à 37°C pendant 4h. Après incubation, 20 µl de BacTiter-Glo (Promega, G8230) ont été ajoutés à chaque puits, puis les plaques ont été incubées pendant 10 min à température ambiante sur un agitateur de plaques orbitales. Après cette incubation, le signal de luminescence a été lu avec un luminomètre (Berthold Centro XS<sup>3</sup> LB 960) avec les paramètres suivants : 5 min de délai par plaque et un temps de comptage de 0,1 seconde par puit.

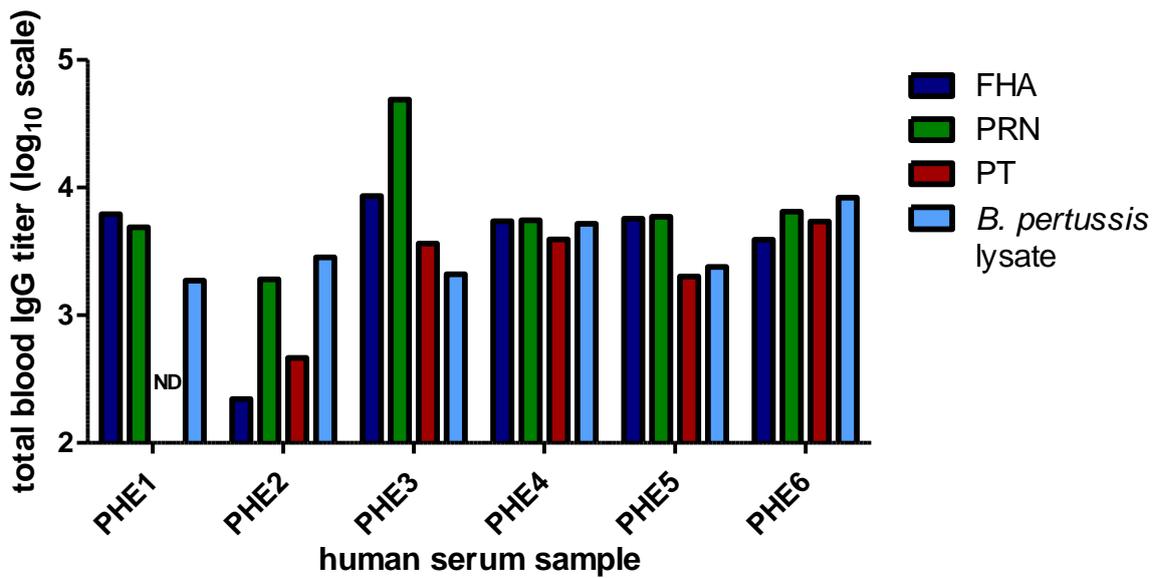
## 2. Résultats

### a. Dosage de la réponse anticorps par ELISA

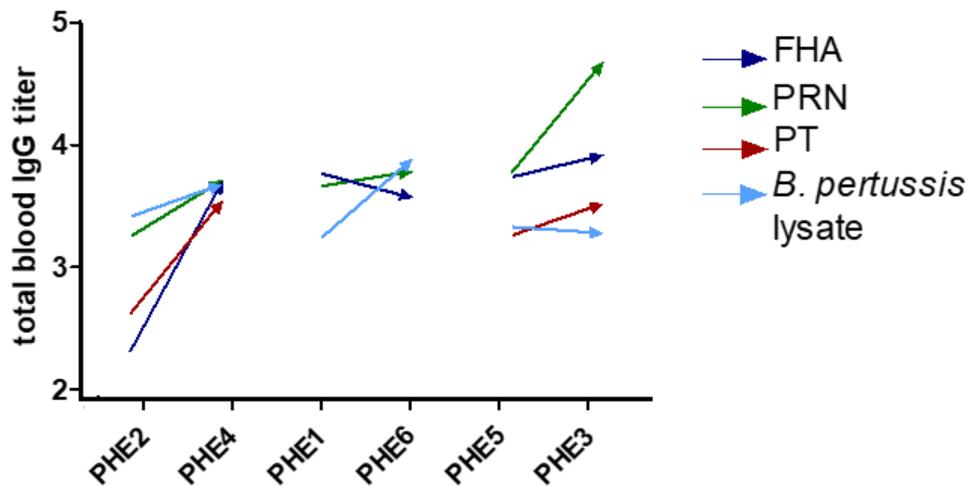
Le dosage des IgG sériques totaux sur 6 échantillons humains (noté PHE1 à PHE6) a été réalisé sur les 3 antigènes majeurs composant les vaccins acellulaires, soit la PT, la FHA et la PRN, ainsi que sur un lysat total de *B. pertussis* (**Fig.49**).

L'échantillon PHE2 montrait les plus faibles taux d'IgG sériques anti-FHA, anti-PRN et anti-PT et les titres anti-PRN et anti-lysat étaient également des plus faibles pour PHE1. Il n'a pas été possible de déterminer le titre en anticorps anti-PT pour l'échantillon PHE1 en raison d'une saturation du signal. Les échantillons PHE3 et PHE4 présentaient globalement des titres d'IgG plus élevés que dans les autres échantillons. Néanmoins, les titres IgG anti-PT et anti-lysat total étaient comparables entre les échantillons PHE3, PHE4, PHE5 et PHE6 (**Fig.49**).

Il est à noter que l'échantillon PHE1 a été préalablement décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min avant réception des échantillons. Il a été montré que le traitement thermique des sérums avait un impact sur le dosage des anticorps anti-PT par la technique ELISA, qui entraîne une surestimation du titre global<sup>282</sup>. Cette observation pourrait expliquer nos résultats pour le dosage IgG anti-PT pour l'échantillon PHE1.



**Figure 49:** Titration par ELISA des IgG sériques totaux contre l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) en bleu foncé, la pertactine (PRN) en vert, la toxine pertussique (PT) en rouge et un lysat total de *B. pertussis* en bleu clair. L'échelle de titration est exprimée en logarithme en base 10. ND=non déterminé.



**Figure 50:** Représentation des titres ELISA d'IgG totaux sériques avant (PHE2, PHE1, PHE5) et après (PHE4, PHE6, PHE3) revaccination avec le vaccin acellulaire Boostrix® pour les échantillons PHE2/PHE4 et PHE1/PHE6 ou Repevax® pour les échantillons PHE5/PHE3. Les titres anti-FHA (bleu foncé), anti-PRN (vert), anti-PT (rouge) et anti-lysate de *B. pertussis* (bleu clair) sont représentés en échelle logarithmique en base 10.

On observe une augmentation d'un facteur 10 du titre en anticorps anti-FHA et anti-PT et d'un facteur 2 pour les anticorps anti-PRN et anti-lysate total après revaccination au Boostrix® pour les échantillons PHE2 et PHE4 (**Fig.50**). Concernant les échantillons PHE1 et PHE6, l'augmentation du taux global d'anticorps était peu marquée. En revanche, on constate une faible augmentation du titre en anticorps anti-PT et anti-FHA mais une augmentation d'un facteur 10 pour les anticorps anti-PRN pour les échantillons PHE5 et PHE3.

#### **b. Test d'inhibition de croissance des échantillons en BGIA**

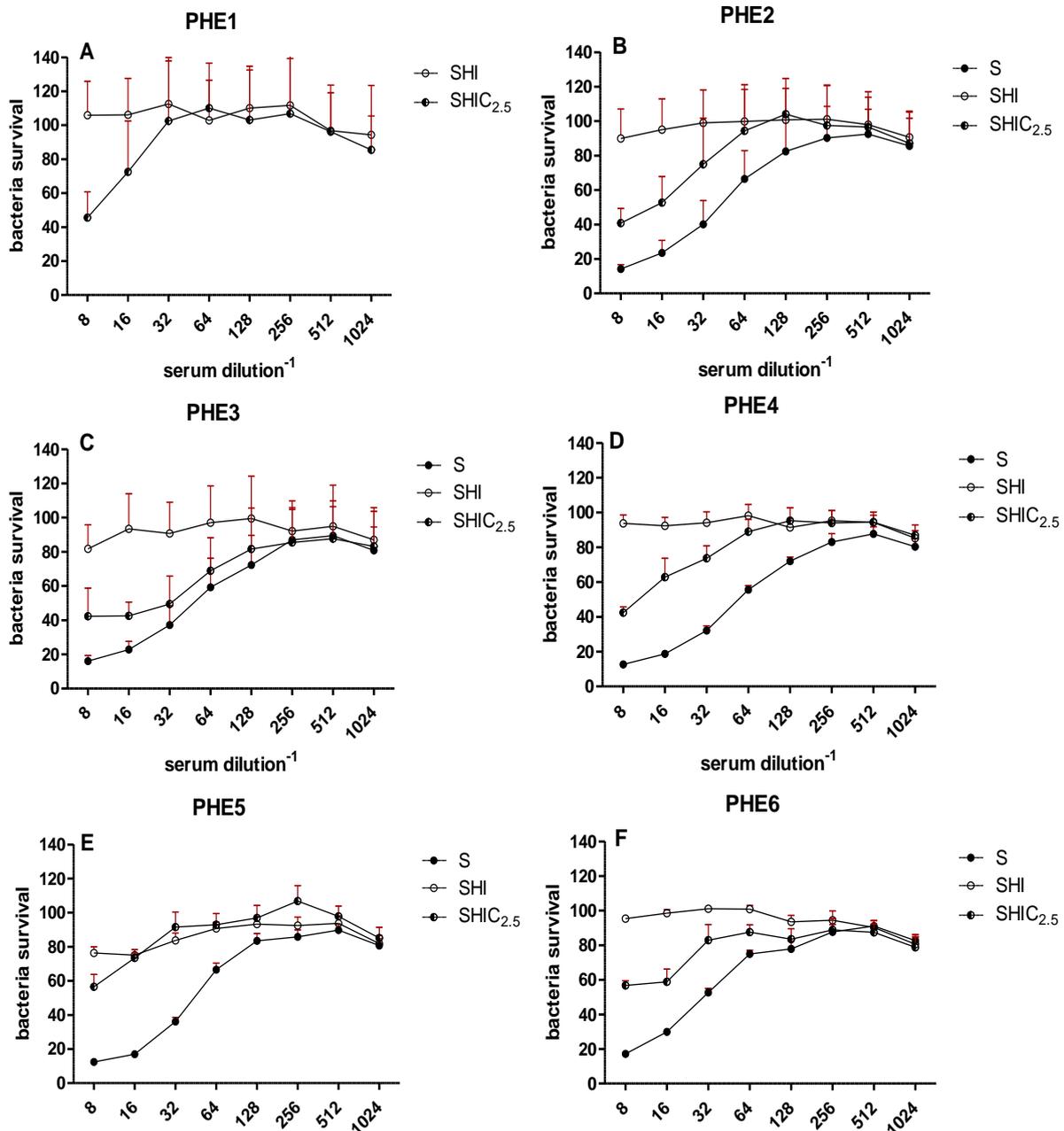
Le BGIA a été réalisé sur les 6 échantillons avec des contrôles internes de plaque (NIBSC, 06/140). L'activité inhibitrice de croissance a été évaluée sur la souche de laboratoire BPSM avec des séras non décomplémentés (courbe notée S), sauf pour l'échantillon PHE1, décomplémentés (courbe notée SHI) et recomplémentés (courbe notée SHC<sub>2.5</sub>). La recomplémentation a été réalisée avec 2.5% de sérum humain déplété en IgG et IgM (**Fig.51**).

Pour les séras non décomplémentés (courbe S), on constate un effet dose-réponse pour chaque échantillon et pour lesquels l'ID<sub>50</sub> a été déterminé, soit 42.43, 48.95, 51.85, 42.24 et 28.16 respectivement pour les échantillons PHE2 à PHE6 (**Fig.51**). Les échantillons PHE3 et PHE4 étaient les plus inhibiteurs alors que l'ID<sub>50</sub> de PHE6 était la plus faible. On constate une augmentation de l'ID<sub>50</sub> entre les échantillons PHE2 et PHE4 d'une part, et entre PHE5 et PHE3 d'autre part (**Fig.51**). Ceci suggère que la vaccination avec les 2 types de vaccins acellulaires avait amélioré l'activité inhibitrice du sérum sur la croissance bactérienne.

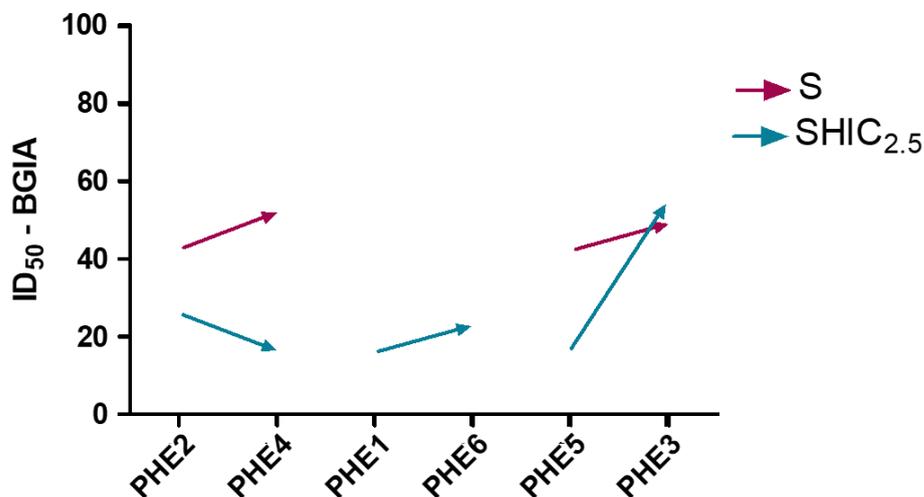
Pour les échantillons PHE1 (**Fig.51A**), PHE2 (**Fig.51B**), PHE3 (**Fig.51C**), PHE4 (**Fig.51D**) et PHE6 (**Fig.51F**), une fois décomplémentés (courbe SHI), les séras n'étaient plus inhibiteurs même aux concentrations les plus fortes, contrairement à l'échantillon PHE5 (**Fig.51E**) qui présente une inhibition d'environ 20% aux fortes concentrations jusqu'à la dilution 1/64<sup>ème</sup>. Cette activité reflète la fonction inhibitrice d'anticorps indépendante de complément.

La recomplémentation des séras conduit également à des effets de dose-réponse sur l'inhibition de croissance des bactéries. Les ID<sub>50</sub> ont également été calculés pour chaque échantillon, soit 16.02, 26.12, 54.35, 16.47, 16.01 et 22.80 pour les séras PHE1 à PHE6, respectivement (**Fig.52**). Les courbes de recomplémentation de chaque échantillon montraient la même pente que les courbes de sérum complet, avec néanmoins des ID<sub>50</sub> plus faibles. Toutefois, les ID<sub>50</sub> calculées pour les paires de séras recomplémentés montraient une augmentation de ce facteur pour 2 des 3 paires de séras, suggérant que le sérum est plus inhibiteur après revaccination avec

le vaccin Boostrix® (chez l'individu d'où proviennent PHE1/PHE6) et Repevax® chez l'individu d'où proviennent PHE5/PHE3 (Fig.52).



**Figure 51:** Courbes d'inhibition de croissance de BPSM après incubation avec des échantillons sériques humains, notés PHE1 (A), PHE2 (B), PHE3 (C), PHE4 (D), PHE5 (E) et PHE6 (F). La survie bactérienne a été évaluée après 4h d'incubation avec les séra non traités, courbes S avec des cercles noirs, ou les séra décomplémentés, courbes SHI avec des cercles blancs, ou les séra recomplémentés, courbes SHIC<sub>2.5</sub> avec des cercles noirs et blancs. La décomplémentation s'est effectuée à 56°C pendant 30 min et la recomplémentation avec 2.5% de sérum humain déplété en IgG et IgM. Ces graphes représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en triplica. Les écarts standards sont spécifiés en rouge pour chaque point de dilution du sérum effectué et la survie bactérienne est exprimée en pourcentage après normalisation. Les courbes S et SHI ont été normalisées sur le maximum de croissance observable après 4h d'incubation des bactéries dans le milieu de dilution des séra et des bactéries (milieu de culture SS) et la courbe SHIC<sub>2.5</sub> a été normalisée par rapport à l'activité inhibitrice de la source de complément seule sur les bactéries après 4h d'incubation

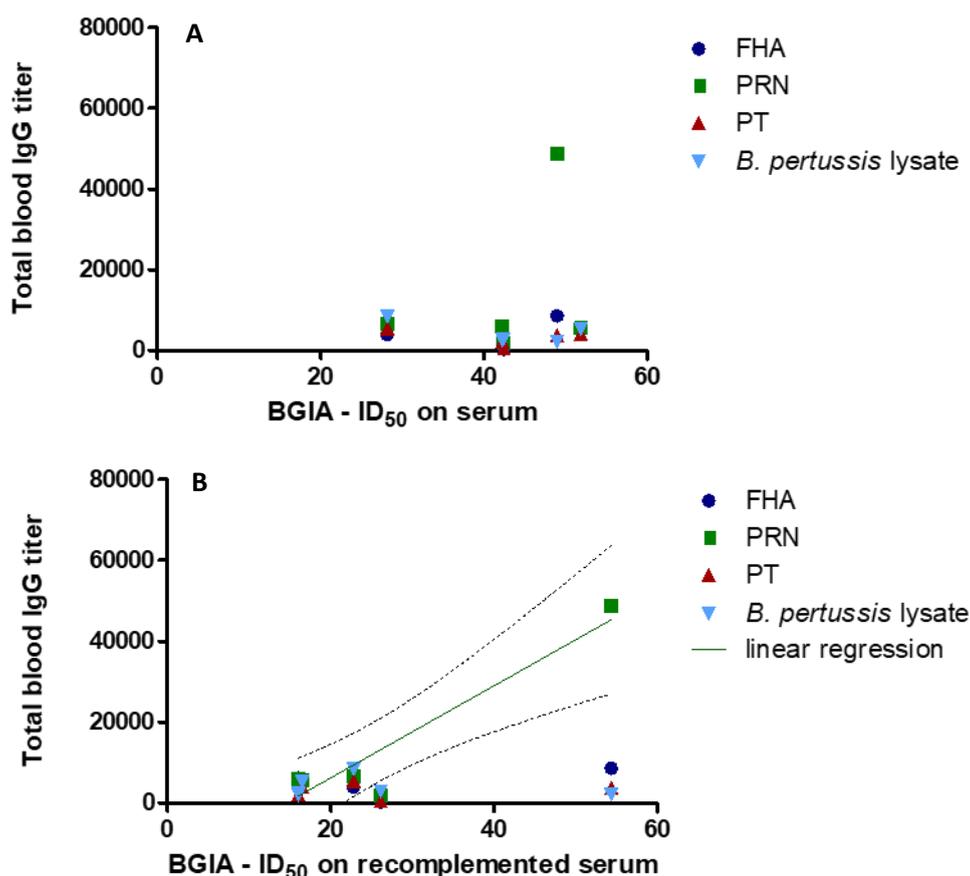


**Figure 52:** Représentation des ID<sub>50</sub> calculés par BGIA pour les échantillons de séra (flèche violette) et de séra reconstitué (flèche bleue) pour les paires de séra.

### c. Corrélation entre titre anticorps et fonction inhibitrice : ELISA versus BGIA

Afin de faire un éventuel lien entre l'activité inhibitrice de croissance et le taux d'anticorps contre un antigène déterminé, nous avons évalué la corrélation entre des données quantitatives de mesures de titres d'anticorps sériques par ELISA et les mesures d'ID<sub>50</sub> d'inhibition de croissance de *B. pertussis* acquises avec le BGIA (**Fig.53**).

Aucune corrélation n'est observable entre les titres anticorps IgG sériques dirigés contre la FHA, PRN, PT ou contre le lysat total de la bactérie et les ID<sub>50</sub> déterminées par la BGIA sur les échantillons de séra humains complets (**Fig.53A**). En revanche, il existe une bonne corrélation, dont le coefficient de détermination est  $r^2 > 0.88$  et la valeur- $p = 0.008415$ , entre le titre d'IgG anti-PRN et l'ID<sub>50</sub> du sérum reconstitué (**Fig.53B**). Il semblerait donc qu'il existe un lien significatif entre les IgG dirigés contre la pertactine et l'activité inhibitrice du sérum dépendante d'anticorps et du complément. Ces résultats sont cohérents avec la littérature qui montre l'induction d'anticorps bactéricides suite à une infection avec une souche virulente de *B. pertussis* de souris préalablement immunisées avec de la pertactine<sup>283,284</sup> et la meilleure efficacité des vaccins acellulaire contenant de la pertactine comparé aux vaccins mono- ou bi-valent<sup>285</sup>.



**Figure 53:** Corrélation des titres IgG totaux, déterminés par ELISA, en fonction des ID<sub>50</sub> d'inhibition de croissance, déterminés par BGIA, sur les échantillons de séra humains. Les titres d'IgG anti-FHA (rond bleu foncé), anti-PRN (carré vert), anti-PT (triangle rouge) et anti-lysate total (triangle inversé bleu clair) sont représentés selon les ID<sub>50</sub> des BGIA obtenues avec les sérums complets (A) ou les séra reconstitués (B) avec 2.5% de sérum humain dépleté en IgG et IgM. Une droite de régression linéaire ( $r^2=0.88$ ,  $p=0.0084$ ) est représentée entre le taux d'IgG anti-PRN et les valeurs ID<sub>50</sub> du BGIA sur sérum reconstitué, ainsi que la déviation de cette droite en ligne pointillée.

### 3. Bilan de l'étude sur la fonctionnalité des anticorps post-vaccination aP chez des adultes

Cette étude préliminaire, sur un faible nombre d'échantillons, a permis de montrer une augmentation du taux d'IgG circulants dans le sang chez des adultes une semaine après revaccination avec les vaccins acellulaires BoostrixTetra® ou Repevax®. De plus, l'activité inhibitrice du sérum complet et reconstitué a été améliorée suite à cette revaccination pour 2 sur 3 des échantillons testés. Cette activité a par ailleurs été liée à la présence d'IgG anti-PRN dans les sérums reconstitués uniquement. De façon intéressante, seul l'échantillon PHE5 présentait une activité inhibitrice du sérum décomplémenté, qui était cependant perdue après revaccination avec le Repevax® (échantillon PHE3).

## **B. Etude qualitative et quantitative de la réponse humorale mère-enfant dans le cadre d'immunisation maternelle**

Dans le cadre d'une collaboration internationale, financée en partie par les fonds de recherche Thrasher, pour étudier la réponse vaccinale des enfants nés de mères ayant été revaccinées pendant la grossesse en Thaïlande, nous avons eu l'opportunité d'étudier la réponse humorale sérique d'un point de vue quantitatif et qualitatif.

La politique de santé publique en Thaïlande préconise la vaccination contre la coqueluche et l'utilisation de vaccins à germe entier. Les données épidémiologiques sont peu renseignées mais une récente étude de surveillance dans un hôpital de Bangkok a montré que 75% d'enfants ayant une coqueluche confirmée avaient moins de 7 mois, et donc n'étaient pas pleinement immunisés<sup>286</sup>. Même s'il semble que la Thaïlande ne connaisse pas de recrudescence de la coqueluche<sup>287</sup>, l'immunisation maternelle<sup>288</sup> est une perspective étudiée afin de protéger les plus jeunes par transfert passif des anticorps maternels.

L'objectif de cette étude était donc de déterminer une éventuelle interférence quantitative et qualitative entre la réponse humorale maternelle médiée par un vaccin acellulaire, et la réponse de l'enfant immunisé avec un vaccin à germe entier. Ce travail collaboratif a fait l'objet d'une publication scientifique dans *Clinical Infectious Diseases* détaillée ci-dessous.

### **1. Publication - Quantité et qualité des anticorps après vaccins anticoquelucheux, acellulaires versus à cellules entières, chez les nourrissons nés de mères ayant reçu le Tdap pendant la grossesse : essai randomisé.**

#### **Quantity and quality of antibodies after acellular *versus* whole cell pertussis vaccines in infants born to mothers who received Tdap during pregnancy: a randomized trial**

Nasamon Wanlapakorn<sup>1,2\*</sup>, Kirsten Maertens<sup>3\*</sup>, Sompong Vongpunsawad<sup>1</sup>, Jiratchaya Peunpa<sup>1</sup>, Thao Mai Phuong Tran<sup>4</sup>, Niel Hens<sup>4,5</sup>, Pierre Van Damme<sup>3</sup>, Anaïs Thiriard<sup>6</sup>, Dominique Raze<sup>6</sup>, Camille Locht<sup>6</sup>, Yong Poovorawan<sup>1\*\*</sup> and Elke Leuridan<sup>3\*\*</sup>

<sup>1</sup>Center of Excellence in Clinical Virology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

<sup>2</sup>Division of Academic Affairs, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

<sup>3</sup>Center for the Evaluation of Vaccination, Vaccine & Infectious Disease Institute, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Antwerp, Belgium

<sup>4</sup>Interuniversity Institute for Biostatistics and statistical Bioinformatics, Hasselt University, Belgium

<sup>5</sup>Centre for Health Economics Research & Modelling Infectious Diseases, Vaccine and Infectious Disease Institute, University of Antwerp, Belgium

<sup>6</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR8204 – CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

**Corresponding author:** Elke Leuridan

Universiteitsplein 1

2610 Wilrijk- Belgium

Tel: +32 3 2652885

Email: [elke.leuridan@uantwerpen.be](mailto:elke.leuridan@uantwerpen.be)

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

\*Both authors equally contributed to the manuscript

\*\*Both authors share the last authorship

**Summary:** Infant wP vaccine responses are blunted after maternal Tdap vaccination. Pertussis antibody titers are higher in aP- than wP-vaccinated infants of immunized mothers, yet quality of antibodies, measured as serum-mediated bacterial growth inhibition, is better after wP than aP vaccination.

## **Abstract**

### **Background:**

The blunting effect of maternal pertussis immunization during pregnancy on infant antibody responses induced by whole cell pertussis (wP) vaccination is not well-defined.

### **Methods:**

This randomized controlled trial (NCT02408926) followed term infants born to mothers vaccinated with tetanus-diphtheria-acellular pertussis (Tdap)-vaccine during pregnancy in Thailand. Infants received either acellular pertussis (aP)- or wP-containing vaccine at 2, 4, 6 and 18 months of age. A comparison group comprised wP-vaccinated children born to mothers not vaccinated during pregnancy. Antibodies against pertussis toxin (PT), filamentous haemagglutinin (FHA) and pertactin (PRN) were evaluated using commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Functionality of antibodies against *B. pertussis* was measured using *B. pertussis* growth inhibition assay (BGIA).

### **Results:**

After maternal Tdap vaccination, 158 infants vaccinated with aP-containing vaccines possessed higher antibody levels ( $p < 0.001$ ) against all tested *B. pertussis* antigens post-priming compared to 157 infants receiving wP-containing vaccines. At one-month post-booster, only anti-FHA and anti-PRN antibodies were still significantly higher ( $p < 0.001$ ) in the aP group. Significantly higher anti-PT and anti-FHA ( $p < 0.001$ ), but not anti-PRN IgG, were observed among 69 wP-vaccinated infants born to control mothers compared to wP-vaccinated infants of Tdap-vaccinated mothers after primary and booster vaccination. The antibody functionality was higher in all wP vaccinated infants at all times.

## **Conclusions:**

Maternal Tdap vaccination inhibited more pertussis-specific responses in wP vaccinated infants compared to aP vaccinated infants, and the control group of unvaccinated women had highest pertussis-specific responses, persisting until after the booster dose. Antibody functionality was better in the wP groups.

*Key words:* pertussis, pregnancy, maternal immunization, humoral immune response, functionality

## Introduction

Pertussis remains difficult to control despite decades of worldwide vaccination. Infants are at highest risk for severe outcomes [1]. The most cost-effective method to protect infants is immunization during pregnancy [2-5]. During the last decade, maternal tetanus, diphtheria and acellular pertussis (aP) (Tdap) vaccination programs have been implemented, mainly in industrialized countries [6].

High titers of naturally-acquired maternal antibodies to pertussis toxin (PT) were previously reported to interfere with infant antibody responses to whole cell pertussis (wP) [7, 8], but not to aP vaccines [9]. In contrast, lowered antibody responses in infants born from Tdap-vaccinated mothers were observed following primary immunizations with aP-containing vaccines, with inconsistent results following a booster dose [10-13]. In many countries, wP vaccines are used within the Expanded Programme on Immunization (EPI). Interference in infant immunity induced by aP vaccines cannot be extrapolated to wP vaccines without additional immunogenicity data [14].

Assessment on how immunization influences bactericidal immunity against *B. pertussis*, as means of measuring quality of antibodies, is of interest [15]. IgG-mediated binding of pathogen causes immobilization or agglutination. In the presence of complement, IgG may be bactericidal. Sera from subjects vaccinated with two-component (Filamentous Hemagglutinin (FHA), PT) aP vaccines did not activate complement-mediated killing [16]. Yet sera of individuals vaccinated with pertactin (PRN)-containing vaccines were able to generate bactericidal activity [17]. To our knowledge, little information exists on the difference in sera bactericidal activity induced by aP- or wP-containing vaccines and its correlations with serum IgG levels, after maternal immunization.

The wP-containing vaccine has been implemented in the Thai EPI program for more than 40 years, while the aP-containing vaccine was introduced ten years ago and is used in private hospitals [18]. Although there has been a resurgence of pertussis, especially among very young infants [19], maternal Tdap immunization has not been implemented. To evaluate the potential effects of implementing maternal Tdap on the responses to aP- *versus* wP-containing vaccines in children, we conducted a prospective randomized controlled clinical trial. The primary objective was to evaluate antibody levels in infants after priming and first booster vaccination with aP- or wP-containing vaccines, in comparison to the EPI schedule. Secondly, the functionality of these antibodies was evaluated.

## **Material and methods**

### *Study design*

This study (ClinicalTrials.gov NCT02408926) was approved by the Institutional Review Board at Chulalongkorn University and the ethical committee of the University of Antwerp. We enrolled healthy pregnant women at King Chulalongkorn Memorial Hospital, who consented to Tdap vaccination (Boostrix®). We assumed that all women received wP-containing vaccines during infancy. The inclusion and exclusion criteria, vaccine reactogenicity, and *B. pertussis*-specific antibody titers in maternal and cord blood were previously described [20]. Written informed consent was obtained from parents prior to infant enrollment. Healthy full-term and late preterm infants born at 36 weeks gestational age with birth weight higher than 2,500 grams, were randomized to receive either aP- (Infanrix hexa®) or wP-containing vaccine (Quinvaxem®). This study was not blinded since wP- vaccinated infants received oral polio vaccine (OPV) whereas aP-vaccinated infants received inactivated poliovirus (IPV) vaccine (hexavalent vaccine).

Simultaneously, a convenience sample of full-term infants born to non Tdap-

vaccinated women was recruited in the same hospital, although not randomized, and this group received the wP-containing vaccine (Quinvaxem®) according to the current Thai EPI (EPI wP group).

### *Study vaccines*

All women, except those from the EPI wP group, received Boostrix® (GSK Biologicals) during the third trimester of pregnancy, containing 8µg of PT, 8µg of FHA, 2.5µg of PRN, 2.5 Lf Diphtheria Toxoid (DT) and 5 Lf Tetanus Toxoid (TT). All infants received aP- or wP-containing vaccines at 2, 4, 6 months of age (priming) and 18 months of age (booster).

Infanrix hexa® (GSK Biologicals) contains 25µg PT, 25µg FHA, 8µg PRN, 30 IU DT, 40 IU TT, 10µg Hepatitis B surface antigen (HBsAg), 10µg *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide and 40, 8, and 32 D-antigen units of IPV type 1, 2, and 3. Quinvaxem® (Biogenetech) contains inactivated *B. pertussis* >4 IU/dose of potency, 30 IU DT, 60 IU TT, 10µg HBsAg and 10µg Hib oligosaccharide. Infants in the wP and EPI wP groups received bivalent OPV (Biofarma®) at 2, 4, 6 and 18 months. World Health Organization (WHO) recommended a switch from trivalent to bivalent OPV in April 2016, and all infants who reached the age of 4 months by 1 December 2015 also received trivalent IPV (IMOVAX polio, Sanofi Pasteur) vaccine containing 40, 8, and 32 D-antigen units of inactivated polioviruses type 1, 2, and 3.

According to the EPI, all infants received bacille Calmette-Guerin (BCG) and monovalent hepatitis B vaccine at birth, measles-mumps-rubella (MMR) vaccine (Priorix®, GSK Biologicals or M-M-R®II, Merck & Co.) at 9 months and Japanese Encephalitis (JE) (CD.JEVAX®, Chengdu Institute of Biological Products) vaccine at 12 and 19 months of age. They received trivalent influenza vaccine (Influvac®, Abbott Biologicals) at 7 and 9 months

of age. Some infants received optional (decision by parents) rotavirus, pneumococcal, varicella zoster or rabies vaccines.

### *Sample collection*

In the aP and wP groups, maternal and cord blood samples were collected at delivery (results published [20]). Cord antibody levels of the EPI wP infants were extrapolated from a Thai historical infant cohort born to mothers who did not receive Tdap during pregnancy [21]. Venous infant blood samples (2.5 mL) were collected at two months of age before the first pertussis-containing vaccine, 28-35 days after the last dose of priming (7 months of age), at 18 months of age before the first pertussis booster, and 28-35 days after the booster (19 months of age). In the EPI wP group, blood samples (2.5 mL) were taken at month 7 and 19.

### *ELISA for antibodies to *B. pertussis* antigens*

Anti-PT, anti-FHA and anti-PRN IgG were analysed in a blinded manner using a commercial ELISA (EUROIMMUN, Lübeck, Germany) according to the manufacturer's instructions. Experiments were performed as previously described [20]. Samples with values below the lower limit of quantification (LLOQ), 5 IU/ml, were calculated as 50% of the LLOQ.

### *Bacterial Growth Inhibition Assay (BGIA)*

Antibody-mediated *B. pertussis* growth inhibition was measured as described in Appendix. Bacterial growth inhibition activity was measured by the ratio of relative luminescence units (RLU) in the well of *B. pertussis* incubated with heat-inactivated sera (complement-independent activity) or untreated sera (complement-dependent activity) divided by RLU in the well of *B. pertussis* alone.

### *Statistical analysis*

With significance level=0.05 and power =0.90, and if the geometric mean concentrations (GMC) of anti-PT IgG was expected to be 20% less in the wP group, with fixed variance, a population of 130 infants in both arms was sufficient. Baseline characteristics are reported as means and standard deviations (SD). Antibody titers are presented as GMC with 95% Confidence Interval (CI). The conventional *t*-test or ONE-WAY ANOVA was used to compare baseline characteristics, GMCs and functionality of antibodies. The paired *t*-test was used to compare the antibody titers in order to make inference about the difference in GMC between month 2-7 and month 18-19 infant sera. The correlations between antibody titers at different time points and between antibody levels and their functionality were calculated using Pearson correlation. We analysed our results as per protocol with significance defined by a p-value of <0.01. Note that relaxing the significance level to 0.05 yields other insights. Blunting of vaccine-induced immune responses was defined as a significantly lower GMC of IgG at one time point in the wP *versus* the wP EPI group.

## **Results**

### *Demographics*

Overall, 370 pregnant women, recruited between April 2015 and September 2016, were vaccinated (Figure 1). From these women, 311 healthy infants were randomized to receive either Infanrix hexa® (aP group; N=156 term and 2 late preterm) or Quinvaxem® (wP group; N=155 term and 2 late preterm). Seventy-nine full-term infants born to non Tdap-vaccinated women received Quinvaxem® (EPI wP group). Baseline characteristics (Table 1) show no significant differences between the groups. Some infants were not vaccinated according to protocol (Table S1) as a result of illness or delayed visits.

### *Antibody responses to B. pertussis antigens*

We discuss all available data (intention-to-treat analysis), since differences between all available data (Table S2) and data with full protocol adherence (Table S3) are not significant. The percentages of values below LLOQ ranged from 0.3% to 12% depending on antigen and time point.

Comparing wP group and EPI wP group, significantly lower anti-PT ( $p < 0.001$ ), anti-FHA ( $p < 0.001$ ), and somewhat lower anti-PRN ( $p = 0.030$ ) titers were found one month after priming in the wP than in the EPI wP group, suggesting interference of maternal antibodies. At one month after the booster dose, interference still persisted for anti-PT ( $p < 0.001$ ) and anti-FHA ( $p < 0.001$ ) IgG.

The EPI wP group had significantly higher anti-PT ( $p < 0.001$ ) IgG levels than the aP group at post-priming and post-booster, yet lower anti-FHA and anti-PRN levels.

Comparing the offspring of vaccinated women, GMCs of all *B. pertussis*-specific antibodies were significantly higher in the aP compared to the wP group following the primary series ( $p < 0.001$ ) (Figure 2). At 18 months of age, all antibody responses substantially waned and the remaining levels were lower than the levels at 2 months of age in both groups. Antibody titers increased significantly for all antigens one month after the booster vaccination. Anti-PT IgG was comparable between both groups, but the aP group possessed significantly higher anti-FHA ( $p < 0.001$ ) and anti-PRN ( $p < 0.001$ ) antibody titers. Within the aP group, significantly higher anti-PT and anti-PRN IgG GMC ( $p < 0.001$ ) were measured post-primary vaccination, compared to pre-priming levels, but their anti-FHA IgG remained at a comparable level (Figure 2). Although infants in the wP group also had significantly higher anti-PT IgG ( $p < 0.001$ ) post-priming, their anti-FHA levels decreased significantly ( $p < 0.001$ ) after priming, whereas the levels of anti-PRN IgG did not change significantly.

A comparison of *B. pertussis*-specific GMC's between infants who only received the

vaccines foreseen in the study and infants who received optional vaccines showed no significant differences (data not shown).

### *Correlation between maternal antibodies and vaccine-induced antibody responses*

Similar to Englund et al (9), we found negative correlations between anti-PT IgG levels at month 2 and month 7 in both the aP and wP group, with a higher coefficient in the wP group; Pearson's correlation coefficient ( $r$ ) = -0.24,  $p$  = 0.006 (aP) vs. -0.32,  $p$  < 0.001 (wP) (Figure S1). In contrast, we found a statistically significant positive correlation between month 2 and month 7 for anti-FHA IgG levels in the wP group ( $r$  = 0.29,  $p$  = 0.001). The only positive and significant correlation was found for anti-PRN IgG between pre-priming (month 2) and post-booster (month 19) antibody levels,  $r$  = 0.23,  $p$  = 0.007 (Figure S2).

### *Functionality of antibodies*

Sera from a subset (depending on the availability of samples at all time points) of samples (N=276) were tested for their ability to inhibit *B. pertussis* growth (Figure 1). Functional activity of all sera, was highly dependent on complement, as demonstrated by the decrease in activity in heat-treated compared to non-treated sera (compare panels A with B and C with D; Figure 3). However, even in the absence of complement, the serum samples expressed various levels of *Bordetella* growth inhibition (Fig. 3A and 3C), suggesting complement-independent *Bordetella* growth inhibition by anti-pertussis sera. This was stronger in maternal and cord blood than in infant sera, whereas the reverse was seen in the presence of complement. In the absence of complement, functionality of antibodies in cord was not significant and maternal sera was not significantly different (Fig. 3A). In the presence of complement, maternal sera were significantly more inhibitory than cord sera (Fig. 3B). At one-month post primary infant vaccination, there was no difference between aP and wP groups

for the heat- treated sera (Fig. 3C). However, at 18 months, heat-treated serum in the wP group was significantly more active than in the aP group (Fig. 3A), persisting for at least one month after the booster (Fig. 3C). Antibodies in infants born to Tdap-vaccinated mothers appeared to better inhibit bacterial growth than those of infants born to unvaccinated mothers after the primary series of wP vaccination, but this was reversed after booster vaccination (Figure 3C).

Analysis in the presence of complement, showed no difference between the aP and wP groups after the primary vaccination (Fig. 3D). However, after the booster vaccination, the wP group inhibited *B. pertussis* growth again significantly better than the aP group.

No correlations between bactericidal activity and anti-PT IgG and anti-FHA levels were found (Figure S3-S4). There were some positive correlations between functional activity and anti-PRN IgG levels in the wP group alone (Figure S5).

## **Discussion**

Blunting of aP-vaccination in infants has been reported after maternal Tdap vaccination [10, 13], and we report for the first time in a large cohort equal blunting of the infant anti-PT and anti-FHA antibody responses to wP-containing vaccines. Our findings are consistent with data showing that naturally acquired maternal antibodies had a negative influence on PT antibody responses induced by DTwP vaccination in infants [9]. Ibrahim et al. [22] recently reported no attenuating effect on infant *B. pertussis*-specific post-primary immunization titers, yet, most infants did not receive the full three-dose wP regimen. This blunting effect may be of clinical relevance. PT is a major virulence factor of *B. pertussis* [23], and humanised neutralizing anti-PT monoclonal antibodies have been shown to abolish disease manifestations in mice and non-human primates [24]. Furthermore, maternal vaccination with a monocomponent PT vaccine protected newborn baboons against disease following respiratory

challenge with *B. pertussis* [25]. In humans low anti-PT IgG titers have been associated with high susceptibility to pertussis, although no correlate of protection is known [26]. From surveillance data in countries where maternal Tdap has been implemented, however, there are no signals of any clinical effect of the reported blunting of the aP infant responses [27]. In the UK e.g., the maternal vaccine coverage has reached over 70% since May 2016. If blunting was clinically important, the rate of pertussis should have increased in children between 6 months – 1.5 years. However, there is no evidence of increased incidence of pertussis among English children. Since we report significantly lower antibody titers in wP- compared to aP- vaccinated children, the lack of clinical significance in aP-vaccinated children cannot be extrapolated to wP-vaccinated children.

Comparing aP and wP group immune responses, the aP group had significantly higher levels of all pertussis-specific IgG after a three-dose priming scheme and anti-FHA and anti-PRN antibody levels were still significantly higher after a booster dose. Previous comparative studies, without maternal immunization, reported that aP-containing infant vaccines induce higher levels of antibodies, due to the higher amounts of antigens in aP compared to some of the wP-containing vaccines [28, 29]. In wP-containing vaccines, the levels of PT, FHA and PRN are not specified [30], resulting in wide ranges of immunogenicity between different manufacturers [31]. Quinvaxem® may contain reduced amount of FHA and PRN resulting in lower-than-expected immunogenicity following primary immunization.

Within the aP group, antibody levels to PT and PRN rose significantly after priming, but anti-FHA IgG did not. Ladhani et al. reported similar findings for anti-PT and anti-FHA IgG in a cohort of aP-vaccinated children [32].

Using a novel *Bordetella* growth inhibition assay (BGIA), complement-dependent growth inhibition was stronger in maternal than in cord blood, likely reflecting the different levels of complement in both tissues. Based on the growth inhibition results in infant sera, the

blunting of antibodies induced by wP-containing vaccines in the presence of maternal antibodies after priming, did not imply a reduction of the bactericidal activity of the antibodies. Inhibition of growth was actually overall better in wP-vaccinated infant sera, and after maternal Tdap vaccination. This suggests that maternal antibodies may endorse this bactericidal activity or even promote the production of infant antibodies with specific biophysical features mediating efficient pathogen control. However, after boosting the bactericidal activity was stronger for wP-vaccinated infants born from unvaccinated mothers compared to infants born to vaccinated mothers, suggesting that the differences observed after priming are mainly due to the activity of maternal antibodies. Studies in a murine model of pertussis [33] indicated that maternal immunization may affect the functionality of antibodies induced by primary aP vaccination of the offspring. We report here a primary observation on the functionality of the induced antibodies during a human trial, although more research is certainly needed. The effect of maternal Tdap vaccination on cell-mediated immunity (CMI) following wP- or aP-containing infant vaccines is also of importance [34]. CMI responses in the present cohort will be reported separately.

The study has a few shortcomings. Infants to the EPI wP group were not randomized and we lacked data on the baseline antibody levels at month 2 for these EPI wP infants, but it is expected that the antibody levels pre-priming were low, based on our previous study [21]. A fourth study arm, aP-vaccinated infants of non-vaccinated mothers, was not added, since many comparative data are already available. The largest relevant study was conducted by Halperin et al [13] reporting that infants born to Tdap-vaccinated mothers had significantly lower antibody titers following primary immunization, persisting until after the first booster.

Altogether we report that Tdap-induced maternal antibodies affect the immune responses to a primary series of vaccines, both quantitatively, especially for anti-PT and FHA IgG, persisting at least until after the booster dose, and qualitatively. No correlation between

antibody levels against PT and levels of growth inhibition was observed, which is consistent with PT being mostly a secreted antigen [35] and therefore not an efficient target for antibodies that mediate growth inhibition or bacterial lysis.

In summary, if countries using wP-containing vaccines for priming of infants, would consider implementing maternal Tdap immunization, the blunting following wP vaccination should be considered. Vaccine-induced immune protection should then closely be monitored and pertussis surveillance should be strengthened.

## **NOTES:**

### ***Contributor statement***

EL is the principal investigator, she conceived the study, and followed up on the entire study conduct. YP and NW are the principal investigators on site. They included and sampled all the subjects, and are responsible for the laboratory analysis on site, and initiated the data analysis. YP, KM, PVD and CL are involved as co- investigators in the entire (Thrasher funded) study. NH and TMPT performed the statistics. TT and SV performed the ELISA laboratory tests. All authors contributed to the writing of the manuscript.

### ***Acknowledgements***

We express our sincere appreciation to our data safety monitoring board members. KM is beneficiary of a postdoctoral mandate fellowship from the FWO (Fund for Scientific Research Flanders; FWO 12R5719N). NH acknowledges support from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement 682540 – TransMID).

### ***Funding***

This study was funded by The Thrasher Research Fund Award no. EWAT 12348, The Thailand Research Fund (IRG5780015), the Research Chair Grant from NSTDA, the Center of Excellence in Clinical Virology (GCE 58-014-30-004), Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. A.T. is the recipient of a fellowship of the Région Haut-de-France and Inserm.

### ***Conflict of Interest***

PVD reports grants to the University of Antwerp from GSK Biologicals, Merck, SP, MSD, Pfizer, SANOFI, Takeda, Baxter, CanSino China, Themis, J&J, The Bill & Melinda Gates Foundation, Flemish Government, European Union, and Abbott, outside the submitted work. All other authors have no conflicts of interest to declare for this manuscript.

## References

1. Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt HJ. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29(3): 449-86.
2. WHO. Pertussis vaccines: WHO position paper - August 2015. Available at: <https://www.who.int/wer/2015/wer9035.pdf?ua=1>. Accessed 17/05/2019.
3. Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *The Lancet* 2014; 384(9953): 1521-8.
4. Dabrera G, Amirthalingam G, Andrews N, et al. A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012-2013. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2015; 60(3): 333-7.
5. Vizzotti C, Juarez MV, Bergel E, et al. Impact of a maternal immunization program against pertussis in a developing country. *Vaccine* 2016; 34(50): 6223-8.
6. ACIP. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women--Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2013; 62(7):131-5.
7. Ahmad SM, Alam J, Afsar NA, et al. Comparisons of the effect of naturally acquired maternal pertussis antibodies and antenatal vaccination induced maternal tetanus antibodies on infant's antibody secreting lymphocyte responses and circulating plasma antibody levels. *Hum Vaccin Immunother* 2016; 12(4): 886-93.
8. Booy R, Aitken SJ, Taylor S, et al. Immunogenicity of combined diphtheria, tetanus, and pertussis vaccine given at 2, 3, and 4 months versus 3, 5, and 9 months of age. *Lancet* 1992; 339(8792): 507-10.
9. Englund JA, Anderson EL, Reed GF, et al. The effect of maternal antibody on the serologic response and the incidence of adverse reactions after primary immunization with acellular and whole-cell pertussis vaccines combined with diphtheria and tetanus toxoids. *Pediatrics* 1995 ; 96(3 Pt 2) : 580-4.
10. Maertens K, Cabore RN, Huygen K, et al. Pertussis vaccination during pregnancy in Belgium: Follow-up of infants until 1 month after the fourth infant pertussis vaccination at 15 months of age. *Vaccine* 2016; 34(31): 3613-9.
11. Maertens K, Hoang TT, Nguyen TD, et al. The Effect of Maternal Pertussis Immunization on Infant Vaccine Responses to a Booster Pertussis-Containing Vaccine in Vietnam. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2016; 63(suppl 4): S197-S204.
12. Munoz FM, Bond NH, Maccato M, et al. Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 311(17): 1760-9.
13. Halperin SA, Langley JM, Ye L, et al. A Randomized Controlled Trial of the Safety and Immunogenicity of Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Vaccine Immunization During Pregnancy and Subsequent Infant Immune Response. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2018; 67(7): 1063-71.

14. WHO. WHO SAGE pertussis working group background paper SAGE April 2014. Available at: [https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1\\_Pertussis\\_background\\_FINAL4\\_web.pdf](https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/april/1_Pertussis_background_FINAL4_web.pdf). Accessed 17/05/2019.
15. Aftandelians R, Connor JD. Bactericidal antibody in serum during infection with *Bordetella pertussis*. *The Journal of infectious diseases* 1973; 128(4): 555-8.
16. Weingart CL, Keitel WA, Edwards KM, Weiss AA. Characterization of bactericidal immune responses following vaccination with acellular pertussis vaccines in adults. *Infect Immun* 2000; 68(12): 7175-9.
17. Weiss AA, Patton AK, Millen SH, Chang SJ, Ward JI, Bernstein DI. Acellular pertussis vaccines and complement killing of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2004; 72(12): 7346-51.
18. Wanlapakorn N, Ngaovithunvong V, Thongmee T, Vichaiwattana P, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. Seroprevalence of Antibodies to Pertussis Toxin among Different Age Groups in Thailand after 37 Years of Universal Whole-Cell Pertussis Vaccination. *PLoS One* 2016; 11(2): e0148338.
19. The bureau of Epidemiology. The Ministry of Public Health T. National Disease Surveillance (Report 506), Bureau of epidemiology, Ministry of public health, Thailand. Available at <http://www.boe.moph.go.th/Annual/AESR2013/annual/Pertussis.pdf>. Accessed 17/05/2019.
20. Wanlapakorn N, Maertens K, Chaithongwongwatthana S, et al. Assessing the reactogenicity of Tdap vaccine administered during pregnancy and antibodies to *Bordetella pertussis* antigens in maternal and cord sera of Thai women. *Vaccine* 2018.
21. Wanlapakorn N, Thongmee T, Vichaiwattana P, Leuridan E, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. Antibodies to *Bordetella pertussis* antigens in maternal and cord blood pairs: a Thai cohort study. *PeerJ* 2017; 5: e4043.
22. Ibrahim R, Ali SA, Kazi AM, et al. Impact of maternally derived pertussis antibody titers on infant whole-cell pertussis vaccine response in a low-income setting. *Vaccine* 2018; 36(46): 7048-53.
23. Coutte L, Loch C. Investigating pertussis toxin and its impact on vaccination. *Future Microbiol* 2015; 10(2): 241-54.
24. Nguyen AW, Wagner EK, Laber JR, et al. A cocktail of humanized anti-pertussis toxin antibodies limits disease in murine and baboon models of whooping cough. *Sci Transl Med* 2015; 7(316): 316ra195.
25. Kapil P, Papin JF, Wolf RF, Zimmerman LI, Wagner LD, Merkel TJ. Maternal Vaccination With a Monocomponent Pertussis Toxoid Vaccine Is Sufficient to Protect Infants in a Baboon Model of Whooping Cough. *The Journal of infectious diseases* 2018; 217(8): 1231-6.
26. Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003; 21(25-26): 3542-9.

27. Campbell H. An update on the maternal pertussis immunization programme in England. In:  
12th International Symposium on Bordetella. Brussels, Belgium, 2019.
28. Vermeulen F, Verscheure V, Damis E, et al. Cellular immune responses of preterm infants after vaccination with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(2): 258-62.
29. Vidor E, Plotkin SA. Immunogenicity of a two-component (PT & FHA) acellular pertussis vaccine in various combinations. *Hum Vaccin* 2008; 4(5): 328-40.
30. WHO. WHO Technical Report Series No 941. Annex 6: Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. Available at: [https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/whole\\_cell\\_pertussis/Annex%20whole%20cell%20pertussis.pdf?ua=1](https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/whole_cell_pertussis/Annex%20whole%20cell%20pertussis.pdf?ua=1). Accessed 26/07/2019.
31. Lambert LC. Pertussis vaccine trials in the 1990s. *The Journal of infectious diseases* 2014; 209 Suppl 1: S4-9.
32. Ladhani SN, Andrews NJ, Southern J, et al. Antibody responses after primary immunization in infants born to women receiving a pertussis-containing vaccine during pregnancy: single arm observational study with a historical comparator. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2015; 61(11): 1637-44.
33. Feunou PF, Mielcarek N, Loch C. Reciprocal interference of maternal and infant immunization in protection against pertussis. *Vaccine* 2016; 34(8): 1062-9.
34. Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, Mills KH. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol* 2012; 5(5): 485-500.
35. Loch C, Coutte L, Mielcarek N. The ins and outs of pertussis toxin. *Febs j* 2011; 278(23): 4668-82.

## **Figure and Table legends**

**Table 1:** Baseline characteristics of participants included in the study. GA, Gestational age; SD, Standard Deviation; mo, month; N/D, Data not available.

**Figure 1:** The consort flow diagram. Tdap; Tetanus- diphtheria and acellular pertussis. GA; Gestational age. aP; acellular pertussis vaccine. wP; whole cell pertussis vaccine. mo; month, BGIA; *B. pertussis* growth inhibition assay. \*One wP child received Quinvaxem® at month 7 which was not according to the protocol.

**Figure 2:** Geometric mean concentrations of (A) anti-PT, (B) anti-FHA and (C) anti-PRN IgG in the aP, wP and EPI wP groups at birth (cord), months 2, 7, 18 and 19. Cord antibody levels of the EPI wP infants were derived from the cord levels of Thai historical infant cohort born to mothers who did not receive Tdap during pregnancy [21]. Error bars indicate the upper bound of 95% confidence interval (CI). \*statistically significant difference compared to pre-priming or pre-booster, \*\* statistically significant difference compared to other groups at month 7 and 19.

**Figure 3:** Ratio of relative luminescence units (RLU) in different circumstances comparing the study groups aP, wP and EPI wP at different time points. Figure 3A & C compared the ratio of RLU in wells containing *B. pertussis* incubated with heat-treated antibody (ab) divided by RLU (ctr) in wells containing *B. pertussis* alone. Figure 3B & D compared the RLU in wells containing *B. pertussis* incubated with untreated antibody plus complement (ab+com) divided by RLU (ctr) in wells containing *B. pertussis* alone. Significance was evaluated using a two-tailed Student's t-test, fig. 3A: \*\*p=0.0089, fig. 3B: \*\*p=0.0017 and \*\*\*p<0.0001, fig. 3C: \*\*p=0.005, \*\*\*p<0.0001 and \*\*\*p=0.0008 (aP vs wP group at month 19) and fig. 3D: \*\*p=0.0043.

Table 1

	<b>aP group (n=158)</b>	<b>wP group (n=157)</b>	<b>EPI wP group (n=79)</b>
Mean age of mothers at enrollment in years (SD)	29.0 (5.4)	28.4 (5.5)	28.0 (5.9)
Mean GA at delivery (SD)	38.7 (1.1)	38.6 (1.1)	38.6 (1.2)
Mean GA at vaccination (SD)	30.5 (2.4)	30.9 (2.2)	NA
Mode of delivery			
- vaginal, n (%)	89 (56.3)	87 (55.4)	45 (56.3)
- cesarean, n (%)	69 (43.7)	70 (44.6)	35 (43.8)
Gender			
-male, n (%)	77 (48.7)	77 (49.0)	44 (55.0)
-female, n (%)	81 (51.3)	80 (51.0)	36 (45.0)
Mean weight at birth in grams (SD)	3127.6 (389.7)	3122.0 (320.6)	3237.4 (417.5)
Mean length at birth in centimeters (SD)	49.6 (2.1)	49.7 (2.0)	N/D
Mean weight at mo 2 in kilograms (SD)	5.4 (0.6)	5.4 (0.6)	5.5 (0.6)
Mean length at mo 2 in centimeters (SD)	57.3 (2.3)	57.3 (2.6)	57.4 (2.3)
Mean weight at mo 4 in kilograms (SD)	6.7 (0.8)	6.8 (0.8)	6.9 (0.7)
Mean length at mo 4 in centimeters (SD)	63.0 (2.5)	63.3 (2.5)	63.5 (2.3)
Mean weight at mo 6 in kilograms (SD)	7.5 (1.0)	7.6 (0.9)	7.8 (0.8)
Mean length at mo 6 in centimeters (SD)	67.2 (3.0)	67.3 (2.5)	67.5 (2.1)
Mean weight at mo 7 in kilograms (SD)	7.9 (1.0)	7.9 (0.9)	8.1 (0.8)
Mean length at mo 7 in centimeters (SD)	69.0 (2.6)	69.3 (2.9)	69.4 (2.2)
Mean weight at mo 18 in kilograms (SD)	10.9 (1.5)	10.9 (1.5)	10.9 (1.2)
Mean length at mo 18 in centimeters (SD)	81.7 (3.4)	81.6 (3.4)	82.1 (2.9)
Mean weight at mo 19 in kilograms (SD)	11.2 (1.5)	11.2 (1.5)	11.2 (1.3)
Mean length at mo 19 in centimeters (SD)	83.2 (3.2)	83.0 (3.3)	83.0 (4.5)
Mean interval between birth and visit month 2 in days (SD)	63.0 (4.6)	62.6 (4.3)	61.6 (5.5)
Mean interval between visit month 2 and visit month 4 in days (SD)	59.9 (5.1)	60.0 (5.2)	61.8 (5.4)
Mean interval between visit month 4 and visit month 6 in days (SD)	60.5 (5.3)	61.6 (4.7)	61.5 (4.7)
Mean interval between visit month 6 and visit month 7 in days (SD)	30.8 (4.3)	31.1 (4.8)	31.7 (5.3)
Mean interval between visit month 18 and visit month 19 in days (SD)	31.8 (6.5)	32.1 (5.7)	31.6 (6.4)

Figure 1

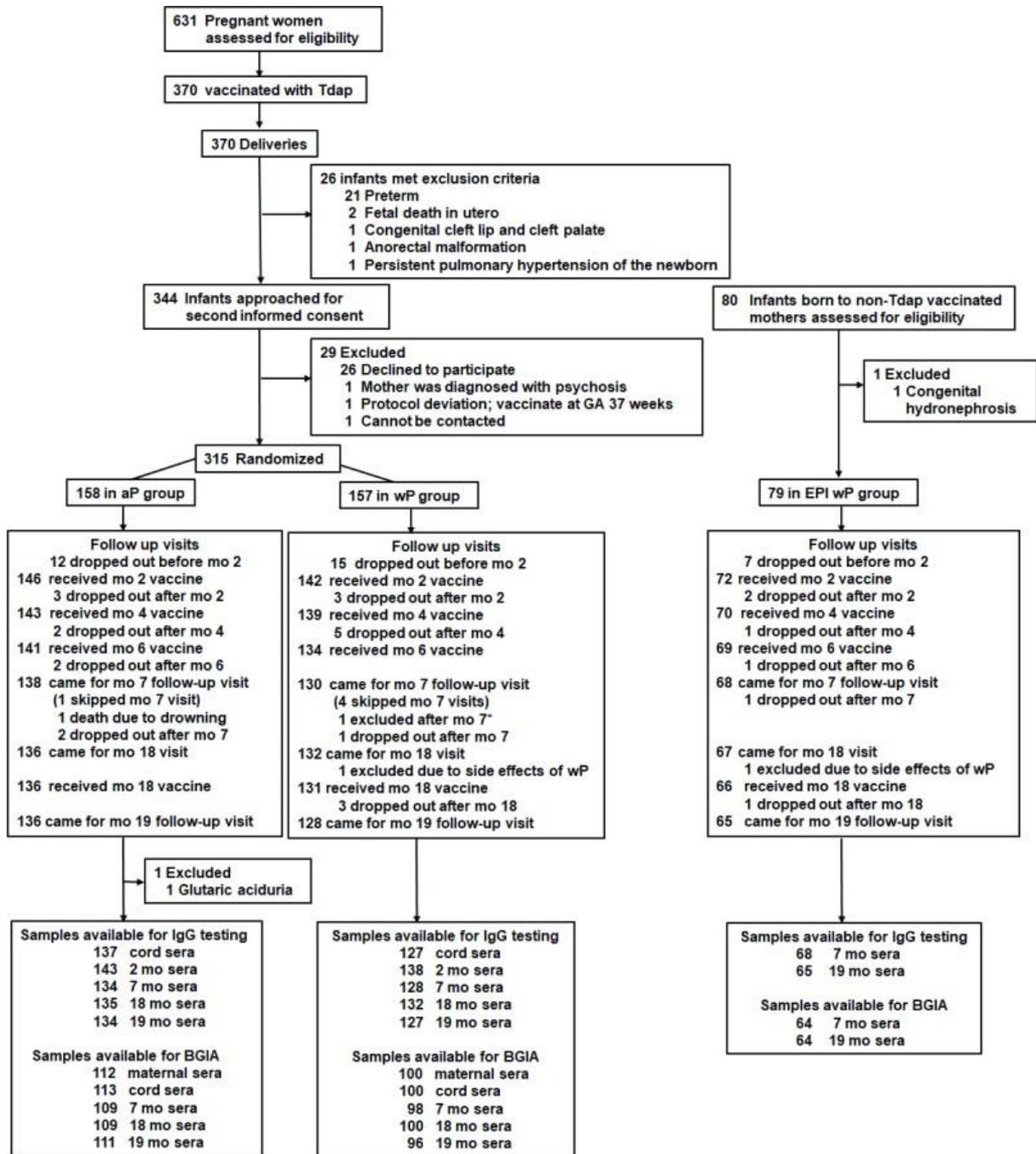


Figure 2

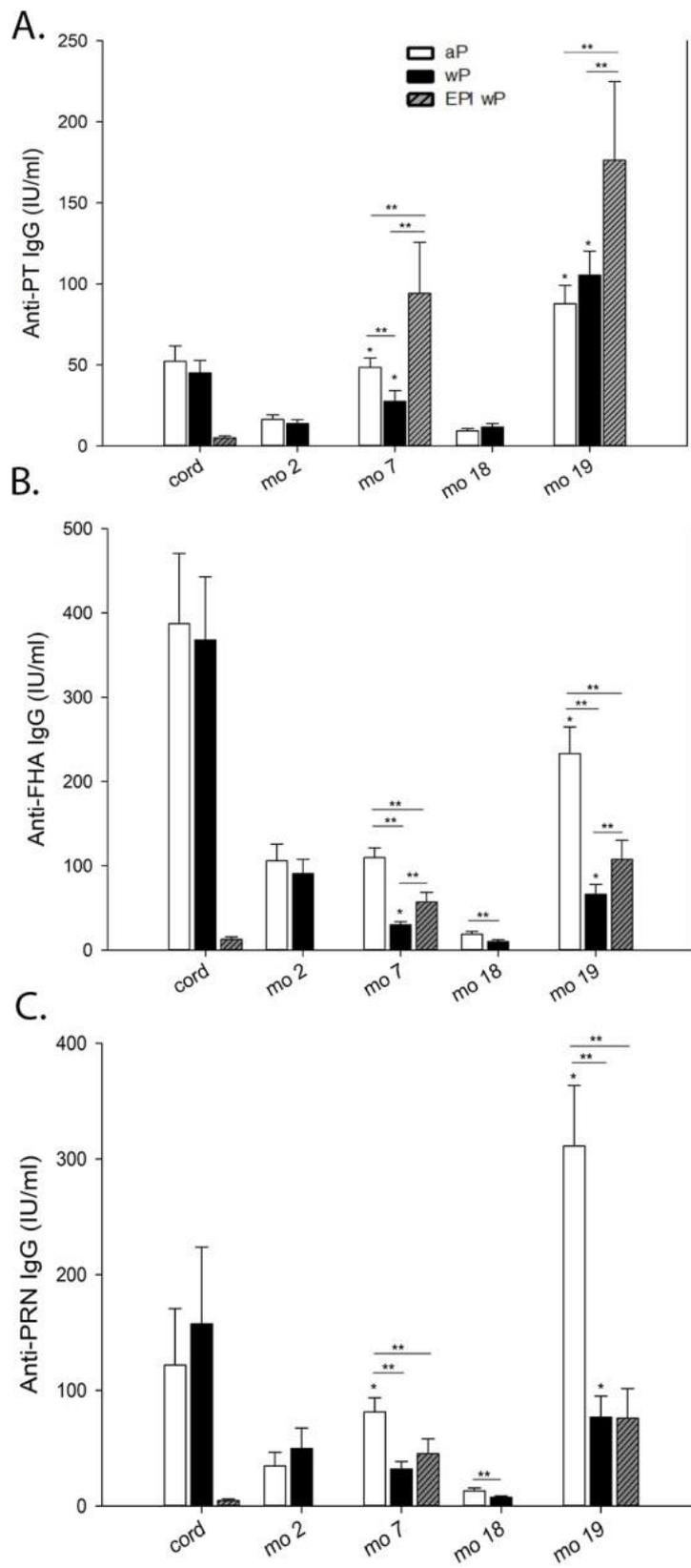
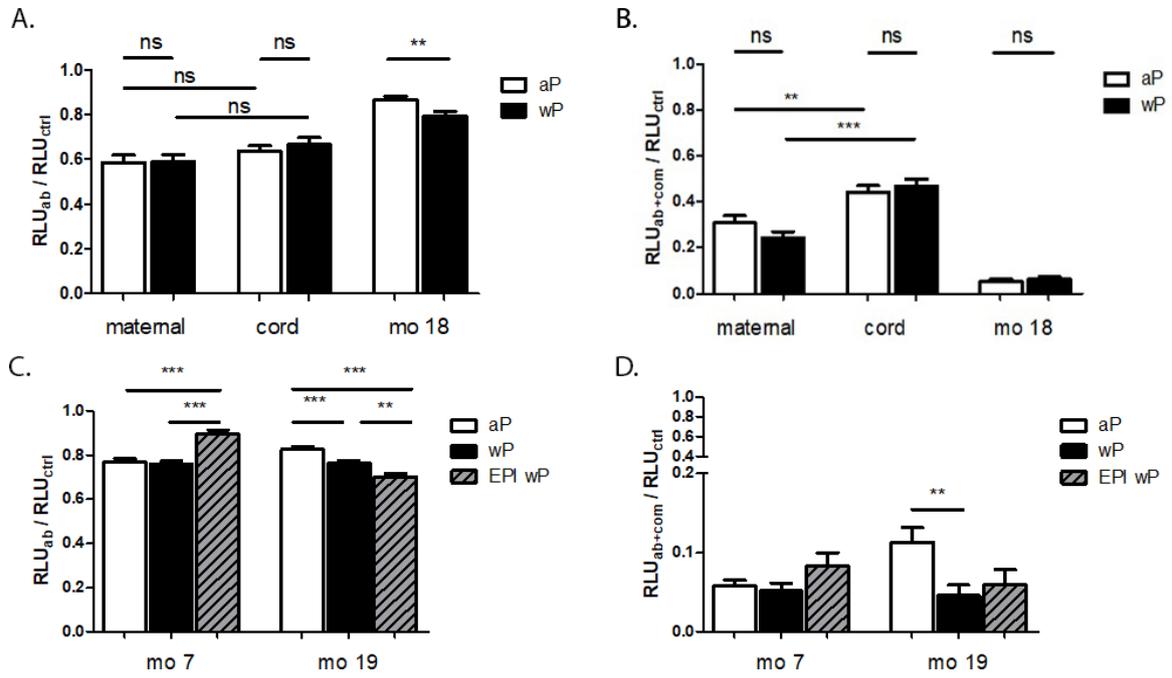


Figure 3



## Supplementary Figures and Tables

Figure S1: Correlations of) A (anti-PT, )B (anti-FHA and )C (anti-PRN IgG between two and seven-month-old aP-vaccinated infant sera and )D (anti-PT, )E (anti-FHA and )F (anti-PRN IgG between two and seven-month-old wP-vaccinated infant sera. Pearson correlation coefficient for anti-PT )aP- = (0.165)  $p = 0.005$ (, anti-PT )wP- = (0.257)  $p < 0.001$ (, anti-FHA )aP = (0.018)  $p = 0.757$ (, anti-FHA )wP = (0.170)  $p = 0.006$ (, anti-PRN )aP- = (0.123)  $p = 0.039$  (and anti-PRN )wP = (0.114)  $p = 0.065$  .(

Figure S2: Correlations of) A (anti-PT, )B (anti-FHA and )C (anti-PRN IgG between two and nineteen-month-old aP-vaccinated infant sera and )D (anti-PT, )E (anti-FHA and )F (anti-PRN IgG between two and nineteen-month-old wP-vaccinated infant sera .Pearson correlation coefficient for anti-PT )aP- = (0.099)  $p = 0.093$ (, anti-PT )wP- = (0.113)  $p = 0.07$ (, anti-FHA )aP- = (0.048)  $p = 0.418$ (, anti-FHA )wP- = (0.087)  $p = 0.158$ (, anti-PRN )aP = (0.145)  $p = 0.016$  (and anti-PRN )wP = (0.093)  $p = 0.134$  .(

Figure S3: Correlation between the growth inhibition activity of serum (ab+com) or decomplexed serum (ab) measured by the BGIA and the amount of anti-PT IgG measured by ELISA. The correlations were made for the aP, wP groups at month 7 (following vaccination) and before and after the boost (month 18 and 19, respectively). For the EPI wP group, correlations were made after vaccination and after the boost (month 7 and month 19, respectively). The BGIA was represented as a ratio of RLU in well containing serum and bacteria divided by RLU in well containing bacteria alone. The ELISA results were expressed in UI/ml on log<sub>10</sub> scale. Correlation analysis was evaluated using a two-tailed Pearson's test.

Figure S4: Correlation between the growth inhibition activity of serum (ab+com) or decomplexed serum (ab) measured by the Bordetella growth inhibition assay (BGIA) and the amount of anti-FHA IgG measured by ELISA. The correlations were made for the aP, wP

groups at month 7 (following vaccination) and before and after the boost (month 18 and 19, respectively). For the EPI wP group, correlations were made after vaccination and after the boost (month 7 and month 19, respectively). The BGIA was represented as a ratio of RLU in well containing serum and bacteria divided by RLU in well containing bacteria alone. The ELISA results were expressed in UI/ml on log<sub>10</sub> scale. Correlation analysis was evaluated using a two-tailed Pearson's test.

Figure S5: Correlation between the growth inhibition activity of serum (ab+com) or decomplexed serum (ab) measured by the Bordetella growth inhibition assay (BGIA) and the amount of anti-PRN IgG measured by ELISA. The correlations were made for the aP, wP groups at month 7 (following vaccination) and before and after the boost (month 18 and 19, respectively). For the EPI wP group, correlations were made after vaccination and after the boost (month 7 and month 19, respectively). The BGIA was represented as a ratio of RLU in well containing serum and bacteria divided by RLU in well containing bacteria alone. The ELISA results were expressed in UI/ml on log<sub>10</sub> scale. Correlation analysis was evaluated using a two-tailed Pearson's test. Pearson's correlation coefficient for anti-PRN wP group at month 19 in decomplexed serum (ab) = 0.2714 (p=0.0045).

Table S1 : Deviations in the study visits

Table S2: Geometric mean concentrations )GMC with (95 %CI of anti-PT, anti-FHA and anti-PRN IgG in cord and infant sera at different time points and *p* values indicating the difference in GMC between different groups or time points) all available data.(

Table S3: Geometric mean concentrations )GMC with (95 %CI of anti-PT, anti-FHA and anti-PRN IgG in cord and infant sera at different time points and *p* values indicating the difference in GMC between different groups or time points) data from infants with full protocol adherence(

Figure S1

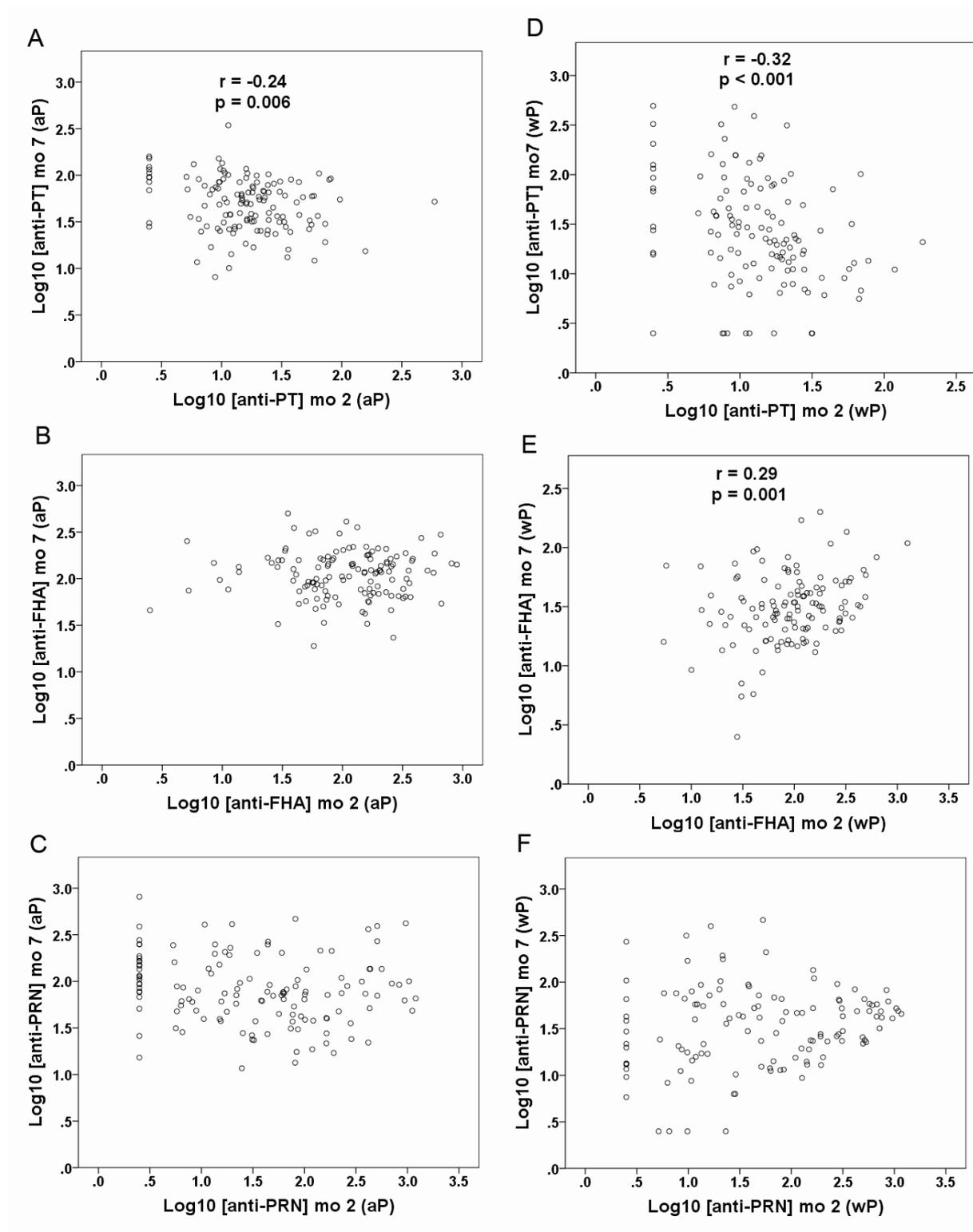


Figure S1

Figure S2

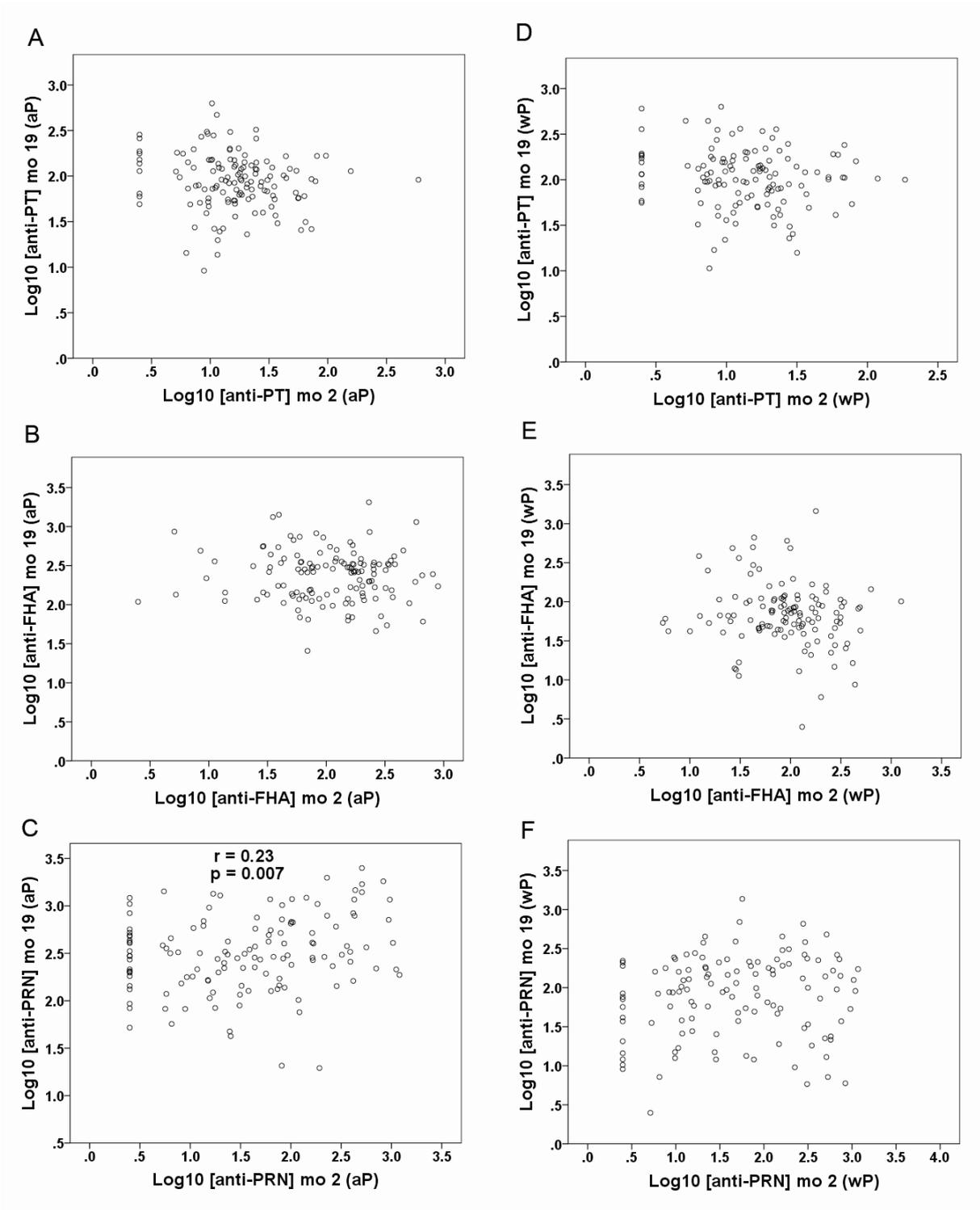


Figure S3

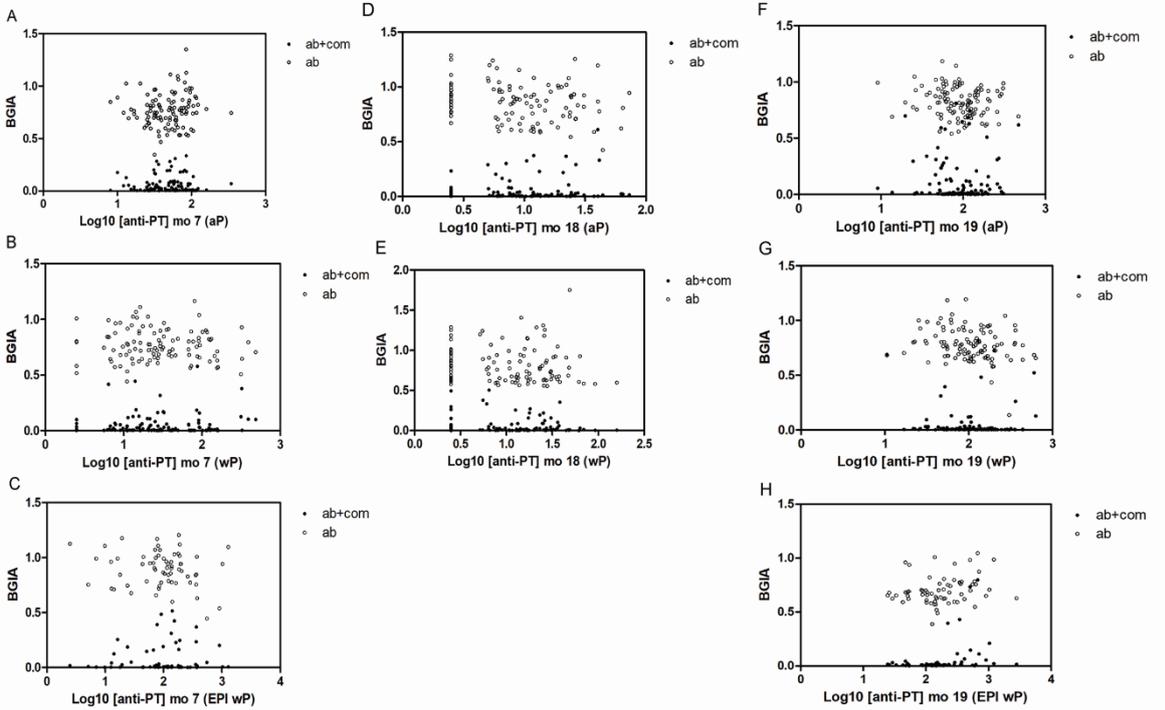


Figure S4

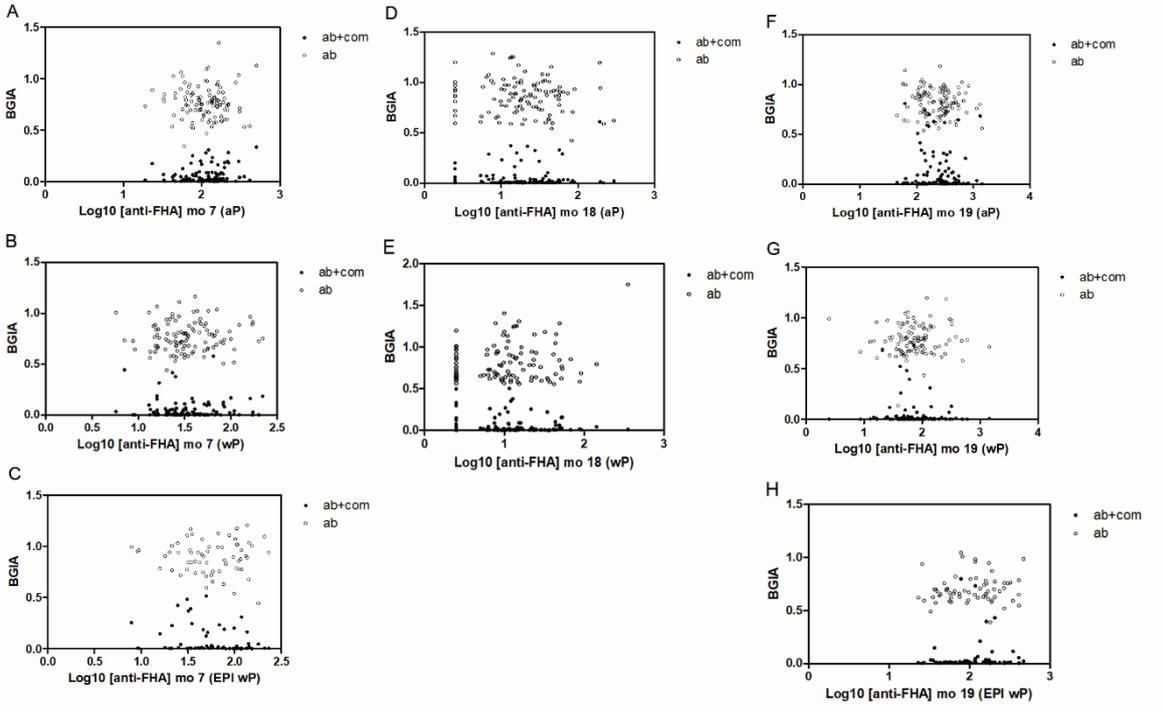
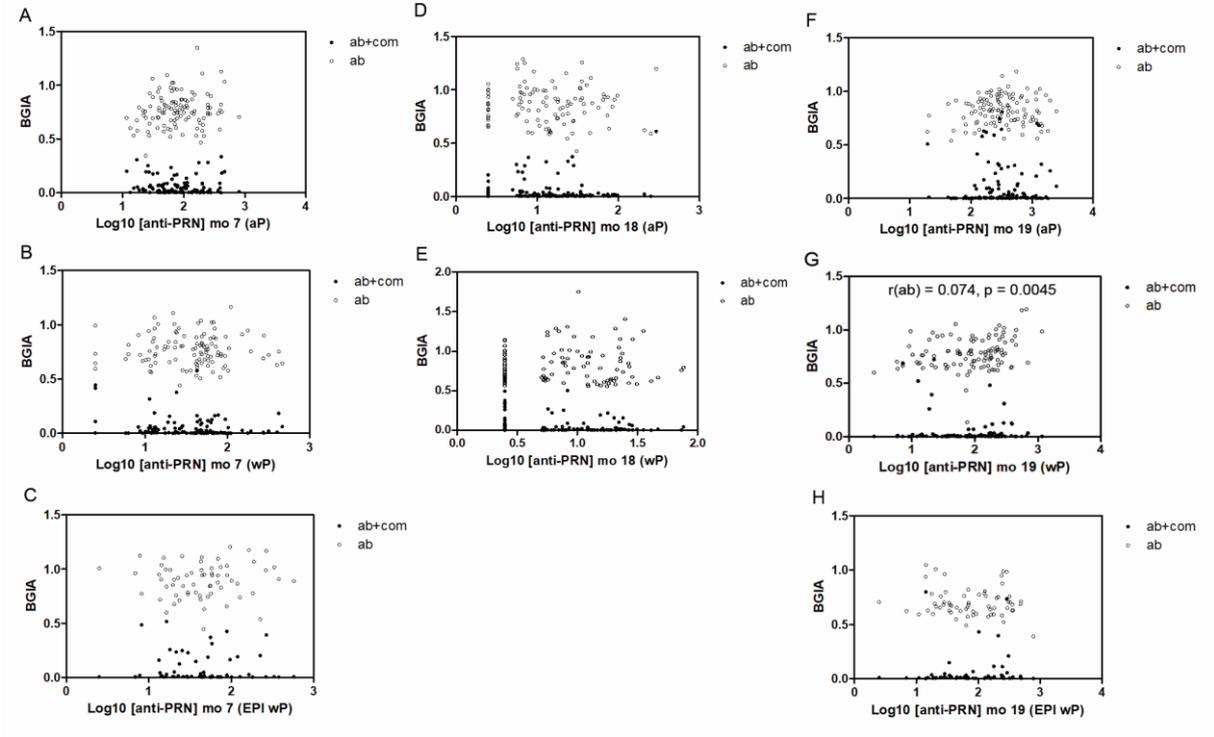


Figure S5



**Table S1 :Deviations in the study visits**

<b>Between birth and month 2</b>					
No.	Group	Code	Interval )days(	Number of deviated days	Reasons
1	aP	C067	78	8	Illness
2	aP	C084	71	1	Delayed visit
3	aP	C100	73	2	Delayed visit
4	aP	C234	79	9	Delayed visit
5	aP	C289	73	3	Illness
6	aP	C333	80	10	Delayed visit
7	wP	C022	71	1	Illness
8	wP	C127	77	7	Delayed visit
9	wP	C153	79	9	Illness
10	wP	C173	71	1	Delayed visit
11	wP	C208	72	2	Delayed visit
12	wP	C215	73	3	Delayed visit
13	EPI wP	C501	88	18	Delayed visit
14	EPI wP	C504	74	4	Delayed visit
<b>Between month 2 and month 4</b>					
No.	Group	Code	Interval )days(	Number of deviated days	Reasons
1	aP	C062	80	10	Delayed visit
2	aP	C316	72	2	Delayed visit
3	aP	C333	77	7	Delayed visit
4	wP	C030	77	7	Illness
5	wP	C184	77	7	Illness
6	wP	C290	77	7	Delayed visit
7	EPI wP	C501	73	3	Delayed visit
8	EPI wP	C511	77	7	Illness
9	EPI wP	C558	73	3	Delayed visit
10	EPI wP	C577	84	14	Illness
<b>Between month 4 and month 6</b>					
No.	Group	Code	Interval )days(	Number of deviated days	Reasons
1	aP	C274	75	5	Illness
2	aP	C299	87	17	Delayed visit
3	aP	C316	84	14	Delayed visit
4	wP	C184	84	14	Delayed visit
5	wP	C230	73	3	Illness
6	wP	C264	77	7	Delayed visit

7	EPI wP	C518	73	3	Illness
8	EPI wP	C521	77	7	Illness
9	EPI wP	C529	77	7	Delayed visit
<b>Between month 6 and month 7</b>					
No.	Group	Code	Interval )days(	Number of deviated days	Reasons
1	aP	C032	42	7	Illness
2	aP	C034	36	1	Delayed visit
3	aP	C052	51	16	Delayed visit
4	aP	C062	27	-1	Limited availability
5	aP	C076	42	7	Illness
6	aP	C090	42	7	Illness
7	aP	C138	42	7	Illness
8	aP	C196	40	5	Illness
9	aP	C207	42	7	Delayed visit
10	aP	C326	27	-1	Limited availability
11	aP	C338	skip	-	Relocation
12	aP	C343	44	9	Delayed visit
13	wP	C041	42	7	Delayed visit
14	wP	C043	39	4	Illness
15	wP	C057	skip	-	Relocation
16	wP	C099	skip	-	Relocation
17	wP	C114	27	-1	Limited availability
18	wP	C119	42	7	Illness
19	wP	C132	49	14	Illness
20	wP	C157	42	7	Delayed visit
21	wP	C209	42	7	Illness
22	wP	C221	skip	-	Relocation
23	wP	C222	37	2	Delayed visit
24	wP	C229	skip	-	Relocation
25	wP	C260	37	2	Delayed visit
26	wP	C302	42	7	Delayed visit
27	wP	C337	42	7	Delayed visit
28	wP	C350	42	7	Illness
29	wP	C351	42	7	Delayed visit
30	wP	C364	47	12	Delayed visit
31	EPI wP	C518	53	18	Delayed visit
32	EPI wP	C519	42	7	Illness
33	EPI wP	C531	49	14	Delayed visit
34	EPI wP	C536	42	7	Delayed visit

35	EPI wP	C542	39	4	Delayed visit
36	EPI wP	C567	41	6	Delayed visit
<b>Between month 18 and month 19</b>					
No.	Group	Code	Interval )days(	Number of deviated days	Reasons
1	aP	C026	49	14	Delayed visit
2	aP	C033	42	7	Delayed visit
3	aP	C047	43	8	Illness
4	aP	C062	44	9	Illness
5	aP	C063	42	7	Delayed visit
6	aP	C088	25	-3	Limited availability
7	aP	C100	49	14	Delayed visit
8	aP	C122	42	7	Illness
9	aP	C150	21	-7	Limited availability
10	aP	C155	42	7	Delayed visit
11	aP	C196	42	7	Illness
12	aP	C206	56	21	Illness
13	aP	C207	42	7	Delayed visit
14	aP	C227	42	7	Illness
15	aP	C232	43	8	Delayed visit
16	aP	C243	36	1	Illness
17	aP	C268	36	1	Delayed visit
18	aP	C273	37	2	Delayed visit
19	aP	C291	42	7	Delayed visit
20	aP	C295	63	28	Delayed visit
21	aP	C320	42	7	Delayed visit
22	aP	C338	50	15	Illness
23	aP	C339	42	7	Delayed visit
24	aP	C342	42	7	Illness
25	wP	C036	59	24	Delayed visit
26	wP	C045	42	7	Delayed visit
27	wP	C115	37	2	Illness
28	wP	C119	42	7	Illness
29	wP	C127	42	7	Delayed visit
30	wP	C132	42	7	Delayed visit
31	wP	C160	49	14	Illness
32	wP	C161	42	7	Delayed visit
33	wP	C166	42	7	Illness

34	wP	C184	49	14	Illness
35	wP	C188	40	5	Illness
36	wP	C229	37	2	Delayed visit
37	wP	C260	42	7	Delayed visit
38	wP	C266	42	7	Delayed visit
39	wP	C359	42	7	Delayed visit
40	wP	C369	45	10	Illness
41	EPI wP	C547	61	26	Delayed visit
42	EPI wP	C550	49	14	Delayed visit
43	EPI wP	C565	25	-3	Limited availability
44	EPI wP	C568	40	5	Illness
45	EPI wP	C575	42	7	Illness

**Table S2: Geometric mean concentrations )GMC with (95 %CI of anti-PT, anti-FHA and anti-PRN IgG in cord and infant sera at different time points and *p* values indicating the difference in GMC between different groups or time points) all available data.(**

Time point	GMC in IU/mL to <i>B. pertussis</i> antigens (95% CI)	aP	wP	wP EPI	p-value (aP vs wP)	p-value (aP vs EPI wP)	p-value (wP vs EPI wP)	p-value (aP before vs after vaccination)	p-value (wP before vs after vaccination)
Cord	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	129 49.7 (42.0- 58.8) 380.8 (311.0- 466.2) 115.1 (81.3- 162.9)	121 44.3 (37.7- 52.1) 365.8 (302.0- 443.0) 153.2 (106.6- 220.0)	NA	0.337 0.778 0.226	NA	NA	NA	NA
Before primary vaccination (month 2)	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	137 16.7 (14.3- 19.5) 108.3 (91.1- 128.7) 36.3 (26.8- 49.1)	132 13.7 (11.7- 16.1) 92.0 (77.3- 109.5) 47.3 (34.8- 64.3)	NA	0.086 0.193 0.229	NA	NA	NA	NA
One month after primary vaccination (month 7)	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	119 48.9 (43.5- 55.0) 111.8 (100.9- 123.9) 82.5 (70.9- 96.1)	109 28.3 (22.4- 35.6) 29.6 (26.0- 33.6) 32.6(27.0- 39.4)	55 93.7 (67.7- 129.6) 55.6 (45.1- 68.4) 44.7 (33.9- 59.0)	<0.001 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 0.063	<0.001 0.558 <0.001	<0.001 <0.001 0.153
Before booster vaccination (month 18)	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	135 9.2 (7.9- 10.7) 18.6 (15.6- 22.1) 12.9 (10.7- 15.5)	132 11.6 (9.8- 13.9) 10.2 (8.4- 12.2) 7.4 (6.3-8.7)	NA	0.049 <0.001 <0.001	NA	NA	NA	NA
One month after booster vaccination (month 19)	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	111 86.1 (75.2- 98.6) 231.8 (201.7- 266.4) 321.7 (271.9- 380.6)	111 106.2 (92.4- 121.9) 66.1 (55.5- 78.7) 76.3 (60.8- 95.5)	60 181.0 (139.7- 234.5) 109.3 (90.1- 132.6) 75.7 (56.5- 101.4)	0.035 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 0.965	<0.001 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 <0.001

**Table S3: Geometric mean concentrations )GMC with (95 %CI of anti-PT, anti-FHA and anti-PRN IgG in cord and infant sera at different time points and *p* values indicating the difference in GMC between different groups or time points) data from infants with full protocol adherence.(**

GMC in IU/mL to B. pertussis antigens (95% CI)		aP	wP	wP EPI	p-value (aP vs wP)	p-value (aP vs EPI wP)	p-value (wP vs EPI wP)	p-value (aP before vs after vaccination)	p-value (wP before vs after vaccination)
<b>Cord</b>	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	137 52.2 (44.2-61.6) 387.4 (318.9-442.9) 121.9 (87.1-170.6)	127 45.1 (44.2-52.7) 367.9 (305.6-442.9) 157.6 (111.0-223.9)	NA	0.209 0.708 0.300	NA	NA	NA	NA
<b>Before primary vaccination (month 2)</b>	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	143 16.4 (14.1-19.1) 106.0 (89.6-125.6) 35.0 (26.0-47.2)	138 13.8 (11.8-16.1) 91.0 (76.9-107.7) 48.3 (35.7-65.4)	NA	0.115 0.211 0.137	NA	NA	NA	NA
<b>One month after primary vaccination (month 7)</b>	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	134 48.4 (43.3-54.1) 109.8 (99.5-121.2) 80.8 (70.1-93.1)	128 27.5 (22.1-34.1) 30.0 (26.6-33.8) 32.1 (26.9-38.4)	68 94.1 (70.5-125.6) 57.1 (47.7-68.3) 45.1 (35.1-57.9)	<0.001 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 0.030	<0.001 0.586 <0.001	<0.001 <0.001 0.027
<b>Before booster vaccination (month 18)</b>	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	135 9.2 (7.9-10.7) 18.6 (15.6-22.1) 12.9 (10.7-15.5)	132 11.6 (9.8-13.9) 10.2 (8.4-12.2) 7.4 (6.3-8.7)	NA	0.049 <0.001 <0.001	NA	NA	NA	NA
<b>One month after booster vaccination (month 19)</b>	N Anti-PT Anti-FHA Anti-PRN	134 87.7 (77.7-99.0) 233.2 (205.3-264.9) 314.9 (269.4-368.0)	127 105.4 (92.4-120.3) 66.2 (56.3-77.8) 76.6 (62.1-94.6)	65 176.4 (138.4-224.8) 107.5 (88.9-130.1) 75.9 (56.8-101.6)	0.044 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 0.961	<0.001 <0.001 <0.001	<0.001 <0.001 <0.001

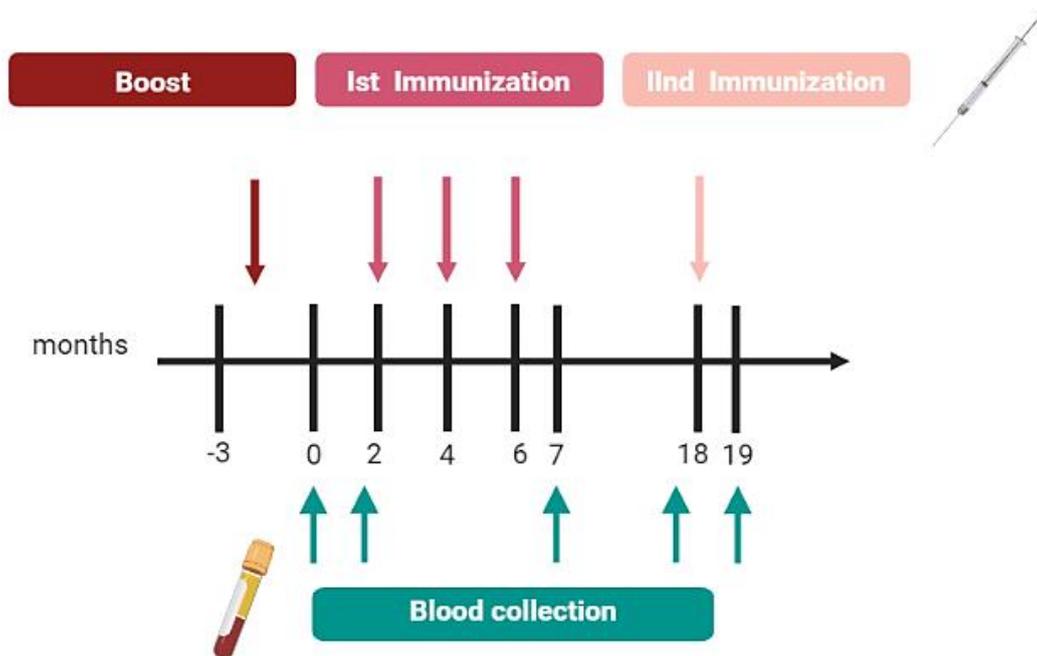
## 2. Résumé de publication

Depuis 1977, la Thaïlande suit le programme étendu de vaccination (EPI) mis en place par l'OMS qui préconise la vaccination globale de la population contre 10 maladies infectieuses, dont la coqueluche<sup>289</sup>. En 1980, l'OMS recense plus de 399.000 cas de coqueluche dans la région Sud-Est Asie contre 17.532 cas en 2018<sup>290</sup>, et plus particulièrement près de 5.000 cas en 1980 en Thaïlande contre 84 en 2016.

Etant donné que les enfants, et notamment les plus jeunes, représentent une population à haut risque de morbidité et mortalité, différentes stratégies, dont l'immunisation maternelle par un vaccin acellulaire, ont été mises en place dans de nombreux pays afin protéger les nouveau-nés par transfert passifs des anticorps maternels<sup>34</sup>. Néanmoins, un phénomène d'atténuation de la réponse anticorps de l'enfant a été montré après primo-vaccination par aP lorsque la mère a été elle-même revaccinée pendant la grossesse avec un vaccin aP<sup>291</sup>. L'effet d'une vaccination hétérologue avec un vaccin cellulaire chez l'enfant issu d'une mère revaccinée avec un vaccin acellulaire pendant la grossesse n'a toutefois pas été bien déterminé. L'objectif de cette étude était donc d'évaluer l'impact de l'immunisation maternelle sur la réponse humorale des enfants Thaïlandais.

L'étude a été menée sur 3 groupes d'enfants, (1) le premier groupe (noté aP group) a été vacciné avec le vaccin acellulaire Infanrix® (GlaxoSmithKline) et dont la mère a été revaccinée pendant le 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse avec le Boostrix® (GlaxoSmithKline), (2) le deuxième groupe (noté wP group) dont la mère a été revaccinée a reçu le vaccin cellulaire Quinvaxem® (Biogenetech) et (3) le troisième groupe (noté EPI wP) suivait les recommandations EPI Thaï et correspondait à des enfants vaccinés avec le vaccin cellulaire. Les critères d'inclusions et d'exclusions de recrutement des couples mères-enfants sont détaillés en Figure 1 ainsi que les caractéristiques, en Table 1, et les biais de suivi, en Table S1, de chaque individu.

D'une part, des prélèvements de sang maternel au moment de l'accouchement et du cordon ombilical permettent de quantifier la réponse humorale transférée à l'enfant et de préciser la nature des anticorps. D'autre part, des prélèvements chez enfant avant la première vaccination (noté mo 2), après l'injection des 3 doses aux mois 2,4 et 6, (noté mo 7), avant le boost (noté mo 18) et après le boost (noté mo 19) ont été réalisés afin de quantifier la réponse anticorps en ELISA (Fig.2, Table S2, Table S3) et leur fonction inhibitrice en BGIA (Fig.54).



**Figure 54:** Ligne de temps suivie pour les immunisations et les prélèvements de sang. Le groupe aP et wP regroupent des enfants dont la mère a été revaccinée pendant le dernier trimestre de grossesse (flèche rouge) avec le vaccin acellulaire Boostrix(R), et qui ont été vaccinés soit avec le vaccin acellulaire Infanrix® (aP) soit avec le vaccin cellulaire Quinvaxem® (wP). Le groupe EPI wP représente des enfants dont la mère n’a pas été revaccinée pendant la grossesse et qui ont été vaccinés avec le vaccin Quinvaxem®. Les enfants ont été vaccinés selon le calendrier vaccinal en rigueur en Thaïlande, l’immunisation primaire (flèche rose foncé) a eu lieu à 2 mois, 4 mois et 6 mois, et l’immunisation secondaire à 18 mois (flèche rose clair). Les prélèvements de sang (flèche bleue) ont eu lieu au mois 0, lors de l’accouchement pour récupérer du sang maternel et ombilical ; à 2 mois, avant la première injection de vaccin ; à 7 mois, soit 1 mois après la fin de l’immunisation primaire ; à 18 mois, juste avant l’immunisation secondaire ; et à 19 mois, soit 1 mois après le rappel.

Dans un premier temps, la réponse anticorps dirigée contre les 3 antigènes majeurs composant les vaccins antioquelucheux a été quantifiée par ELISA, Les IgG anti-FHA (Fig.2B) étaient fortement présentes dans le sang de cordon, ainsi que les IgG anti-PRN (Fig.2C) et en moindre quantité les IgG anti-PT (Fig.2A). Ces anticorps étaient présents dans le cordon en proportion équivalente entre les groupes aP et wP. Par ailleurs, un faible titre IgG dirigés contre ces 3 antigènes était mesurable dans le groupe EPI wP, montrant la présence résiduelle d’anticorps circulants spécifiques à *B. pertussis*. De plus, 2 mois après la naissance et juste avant la première immunisation vaccinale, les titres d’IgG contre chaque antigène du groupe EPI wP n’étaient plus quantifiables et ceux pour les groupes aP et wP avaient diminué de moitié, mais étaient quand-même plus élevés que ceux du groupe EPI wP. Ces résultats indiquent que les anticorps maternels transférés passivement avaient une durée de vie d’au moins 2 mois chez le nouveau-né. Plus particulièrement, des résultats complémentaires montrent une corrélation ( $p < 0.001$  et  $p = 0.001$ ) entre le taux sérique d’IgG anti-PT et anti-FHA,

respectivement, mesurés à 2 mois et à 7 mois pour le groupe wP (Fig.S1D et Fig.S1E), mais qui n'est plus observable après 19 mois (Fig.S2). Comme pour le groupe wP, le taux sérique d'IgG anti-PT du groupe aP (Fig.S1A) à 7 mois dépendait du taux sérique à 2 mois ( $p=0.006$ ). Enfin, le taux d'IgG anti-PRN du groupe aP à 19 mois corrélait ( $p=0.007$ ) avec le taux mesuré à 2 mois (Fig.S2D).

Après les 3 doses de vaccination anti-coqueluche, le taux d'IgG anti-PT et anti-PRN augmentait alors que le titre d'IgG anti-FHA restait inchangé pour le groupe aP. En parallèle, seul le titre IgG anti-PT augmentait pour le groupe wP alors que le titre d'IgG anti-FHA diminuait et le titre d'IgG anti-PRN restait stable par rapport aux titres de pré-immunisation. Au mois 18, il y avait une diminution significative des titres IgG pour chaque antigène dans les 2 groupes avec toutefois une différence statistiquement significative entre les anticorps anti-FHA et anti-PRN pour le groupe aP. Ces résultats montrent qu'il existe une atténuation de la réponse anticorps anti-FHA et anti-PRN post immunisation primaire chez les enfants vaccinés avec le wP et dont la mère a été revaccinée.

Suite au rappel vaccinal, les titres d'IgG anti-FHA/PRN/PT mesurés à 19 mois étaient augmentés pour les groupes aP et wP avec une meilleure réponse pour les IgG anti-FHA et anti-PRN du groupe aP, sans différence entre les IgG anti-PT du groupe aP et wP.

Concernant le groupe EPI wP, les titres en anticorps étaient supérieurs au mois 19 comparé au mois 7. Cependant, les titres d'IgG anti-PT et anti-FHA étaient également significativement supérieurs à ceux mesurés pour le groupe wP aux mois 7 et 19, sans différence pour les titres d'IgG anti-PRN, impliquant un effet modulateur de la vaccination maternelle sur la réponse humorale de l'enfant à une vaccination wP pour les anticorps anti-PT et anti-FHA.

Dans un deuxième temps, l'étude de la fonctionnalité des sérums en termes d'inhibition de croissance de *B. pertussis* a été réalisée grâce à l'application du BGIA sur les échantillons de sérums maternels et infantiles (Fig.3). L'étude de l'activité dépendante d'anticorps a permis de montrer qu'il n'y avait pas de différence d'inhibition de croissance entre les groupes aP et wP dans le sang maternel ni dans le sang ombilical (Fig.3A et 3B). Ce dernier induit moins d'inhibition de croissance que le sang maternel lorsque le sang est non-décomplémenté, suggérant une modulation quantitative des protéines du complément dans le sang de cordon.

Après l'immunisation primaire, à 7 mois, l'activité inhibitrice du sérum était identique entre les groupes aP et wP (Fig.3C et 3D), mais une différence significative dans l'activité des anticorps indépendante de complément était observée entre le groupe wP et le groupe EPI wP, montrant l'efficacité de la vaccination maternelle dans l'induction d'anticorps inhibiteurs de croissance bactérienne. Pourtant, après le rappel vaccinal, à 19 mois, l'activité inhibitrice du sérum du groupe EPI wP était supérieure à celle du groupe aP et l'activité anticorps indépendante de complément

était supérieure pour le groupe EPI wP comparé au groupe wP (Fig.3C). Ces résultats montrent qu'après la première immunisation, la vaccination maternelle induit des anticorps inhibiteurs mais qu'après le rappel vaccinal, la vaccination pendant la grossesse semble interférer significativement sur la qualité effectrice de la réponse humorale.

Dans un troisième temps, nous avons pu constater que l'activité inhibitrice du sérum décomplémenté observée au mois 19 pouvait être corrélée ( $p=0.0045$ ) avec le titre d'IgG anti-PRN (Fig.S5) du groupe wP. Aucune corrélation n'a pu être établie avec les titres d'IgG anti-FHA (Fig.S4) et anti-PT (Fig.S3).

Cette étude aura donc permis de mettre en lumière l'interférence de la vaccination maternelle acellulaire sur la réponse anticorps de l'enfant après immunisation primaire au vaccin cellulaire, et ceci d'un point de vue quantitatif, notamment sur le titre d'IgG anti-PT et anti-FHA, qui persiste après le rappel vaccinal, et d'un point de vue qualitatif sur la fonction inhibitrice des anticorps induits.

## Discussion

## **X. Discussion et perspectives**

Les travaux menés pendant ces 3 années de thèses ont permis d'avancer dans la description de la réponse anticorps induite lors d'une vaccination anticoquelucheuse ou d'une infection à *B. pertussis*. Pour ce faire, différentes perspectives d'étude ont été menées. Un test d'inhibition de croissance des bactéries, le BGIA, a été mis au point pour évaluer la fonctionnalité de diverses biomolécules inhibitrices-antibiotiques, anticorps. Une étude structurale et fonctionnelle d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'adhésine majeure de la bactérie, la FHA, a été entreprise pour déterminer les liens structure-fonction-protection. La relation entre l'amplitude de la réponse anticorps antigène-spécifique et les propriétés inhibitrices des anticorps (in)dépendantes de complément a été évaluée dans le cadre d'une infection naturelle, d'une vaccination ou d'un challenge dans les modèles murin, babouin et humain. Ces différentes approches ont amené des éléments de réponse pour la caractérisation de la réponse humorale et des antigènes protecteurs mais ont soulevé des interrogations ouvrant de nouvelles perspectives.

Les objectifs étaient d'identifier des biomarqueurs d'une immunité humorale protectrice et de comprendre ces mécanismes protecteurs sous-jacents, médiés lors d'une infection ou d'une vaccination. La qualité de la réponse immunitaire induite et notamment la fonctionnalité de la réponse anticorps façonnée par la vaccination a été évoquée pour illustrer la résurgence de la coqueluche dans les pays à fort taux d'immunisation préconisant la vaccination acellulaire<sup>292</sup>.

Le projet de thèse s'inscrit donc dans un contexte d'étude de la réponse humorale pour identifier un corrélat de protection contre la maladie, l'infection ou la colonisation, encore non-élucidé à ce jour pour la coqueluche.

### **A. Développement d'un outil fonctionnel : le BGIA**

Le BGIA a été mis au point spécifiquement pour l'étude d'inhibiteurs, statiques et lytiques, sur la croissance de *B. pertussis*. La technique est basée sur la mesure d'inhibition de croissance par luminescence grâce à une réaction enzymatique dépendante d'ATP, qui est un marqueur d'activité métabolique. Différentes molécules inhibitrices comme les antibiotiques, le complément et les anticorps ont été évaluées en BGIA.

Le développement du BGIA a nécessité d'optimiser (1) des paramètres biologiques, à savoir le choix des milieux de culture liquide, la phase de croissance

arrêtée des bactéries, la souche bactérienne utilisée, la source de complément à utiliser et sa concentration et (2) des paramètres techniques, comme le choix du luminomètre et les temps et conditions d'incubations. Ces points ont été discutés dans l'article cité en section V.A.

Le BGIA est une méthode simple et rapide pour évaluer les CMI ou les IC50 d'antibiotiques nécessaires à inhiber la croissance de *B. pertussis*, et les résultats sont comparables avec les méthodes classiques<sup>293</sup>. Avec l'apparition de souches circulantes de *B. pertussis* résistantes aux macrolides : érythromycine, clarithromycine et azithromycine<sup>56,58,60,294</sup>, notamment aux USA et en Chine et plus rarement en France et en Iran, le contrôle de la propagation de ces souches semble être essentielle. Cette résistance serait liée à une pression sélective due à l'usage des macrolides – antibiotiques utilisés contre divers pathogènes - résultant d'une mutation dans le site de fixation de l'érythromycine sur l'ARNr 23S de la sous-unité 50 du ribosome<sup>295,296</sup>. En cas de doutes, l'application du BGIA à haut débit sur les bactéries circulantes recueillies lors de pics épidémiques permettrait de connaître rapidement la susceptibilité de *B. pertussis* aux macrolides et d'ajuster le traitement antibiotique pour limiter la transmission de ces souches antibiorésistantes. De plus le BGIA pourrait être envisagé pour décider de l'utilisation d'autres familles d'antibiotiques pour le traitement de la coqueluche.

Nous avons également montré en BGIA qu'une souche de laboratoire avait une sensibilité au complément différente d'un isolat clinique récent. Cette différence de sensibilité est probablement due à une perte de virulence de la souche de laboratoire et à un meilleur fitness de l'isolat clinique lors de la pathogenèse. L'étude de l'interaction des bactéries avec le complément permet donc d'évaluer partiellement la résistance des bactéries face à la réponse immunitaire induite. Par ailleurs, il a été montré que la pression vaccinale acellulaire pouvait moduler cette interaction et impacter la lyse bactérienne complément-dépendant<sup>234</sup>. Nous disposons au laboratoire d'un panel d'isolats cliniques, qu'il serait intéressant d'évaluer en BGIA pour d'une part déterminer la résistance au complément de ces isolats et d'autre part tester leur sensibilité sur différents types de sérums immuns (post-vaccination, convalescent). Les objectifs seraient de montrer l'évolution de la sensibilité des bactéries au complément et l'impact de la vaccination sur la fonctionnalité des anticorps induits face à ces isolats.

De plus, l'étude de la résistance au complément a permis d'identifier des facteurs de virulence qui permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire<sup>140</sup>. Parmi ces facteurs de virulence BapC, BrkA et Vag8 inhibent la voie classique du complément. Ces facteurs appartiennent tous à la famille des autotransporteurs et leur expression est régulée par le système à 2 composants BvgAS. Toutefois, la PRN qui est également un autotransporteur, produit des anticorps bactéricides chez la souris<sup>283</sup>. Dans le but d'identifier d'autres facteurs de virulence impliqués dans la résistance au complément ou inducteur d'anticorps

bactéricides, nous nous sommes intéressés à 2 autres autotransporteurs qui sont le TcfA (construction de la souche déficiente pendant la thèse) et SphB1 (souche déjà construite) qui par leur similarité de structure avec la PRN seraient susceptibles de générer des anticorps bactéricides après administration chez la souris. Ces souches déficientes en TcfA ou SphB1 ont montré respectivement un défaut de colonisation des bactéries dans la trachée<sup>109</sup> et dans les poumons<sup>297</sup> dans un modèle souris, et seraient donc potentiellement des antigènes protecteurs à inclure dans la composition des vaccins aP. Des souches déficientes en Vag8 et BrkA ont également été construites pendant la thèse pour générer des doubles mutants et potentiellement exacerber le phénotype de sensibilité au complément. Etant donné que le BGIA ne requiert pas de manipulations génétiques pour la détection des souches bactériennes, l'analyse de ces souches cliniques ou issues de modifications génétiques ciblées sur la résistance au sérum et au complément pourrait s'effectuer en BGIA.

Outre l'activité inhibitrice du sérum, des essais préliminaires sur l'effet inhibiteur sur la croissance de *B. pertussis* de lavages broncho-alvéolaires et de lavages de nez, issus de souris, ont été réalisés en BGIA. Cependant, ces tests n'ont pas été concluants. En effet, les échantillons ont été fortement inhibiteurs dans les groupes souris contrôles (naïves) et infectées. La présence de protéines inhibitrices<sup>298</sup> comme le surfactant, la lactoferrine, le lysozyme et d'autres peptides antimicrobiens peuvent expliquer ces résultats. Une séparation des protéines par exclusion de taille permettrait de fractionner les échantillons pour identifier les fractions inhibitrices et renseigner le rôle protecteur des slg présents dans les sécrétions mucosales.

Le BGIA dérive du test fonctionnel de référence SBA et a été développé pour être utilisé lors d'études d'efficacité vaccinale à grande échelle. La réponse humorale suite à une vaccination est évaluée selon l'activité bactéricide (SBA) et l'activité opsonophagocytaire (OPA) des anticorps<sup>292</sup>. Ces propriétés définissent une réponse anticorps fonctionnelle et peuvent définir un corrélat de protection, comme c'est le cas pour les vaccins méningocoques<sup>299</sup>. Néanmoins, aucun corrélat de protection contre l'infection n'est défini pour *B. pertussis*, même si la présence d'un haut titre d'IgG anti-PT corréle avec une protection contre les symptômes graves de la coqueluche<sup>159</sup>.

## B. Lien entre structure-fonction-protection : étude des mAbs anti-FHA

L'étude d'anticorps monoclonaux chez *B. pertussis* a pour but de typer des isolats cliniques<sup>300</sup>, de résoudre les mécanismes moléculaires et les structures responsables de l'activité immunogénique des facteurs de virulence<sup>301,302</sup> et de caractériser les domaines fonctionnels garant d'une activité protectrice<sup>257,258,269</sup>.

Après purification des mAbs anti-FHA, nous avons constaté que les mAbs F4 et F8 possédaient 2 chaînes lourdes en équimolarité à des tailles différentes. Cette observation ne semble pas être liée à une contamination de la culture d'hybridome par un autre clone dans la mesure où la taille de la chaîne légère ne semble pas indiquer la présence d'un mélange polyclonal. La séquence protéique de ces HC pourrait être analysée en spectrométrie de masse et le profil de glycosylation par digestion enzymatique. Parallèlement, ces 2 mAbs montrent une affinité similaire et distincte des autres mAbs en ELISA et en SPR, suggérant un lien entre cette structure particulière et l'affinité à l'antigène. Les 9 mAbs anti-FHA reconnaissent un même épitope situé dans la région N-terminale de la FHA entre 1880-2040aa. Nous n'avons pas pu préciser davantage la région reconnue par les mAbs à cause de difficultés de production et de purification des peptides recombinants. D'autres tests, comme l'inhibition de l'agglutination des érythrocytes et de l'adhérence sur cellules CHO<sup>259</sup> seraient à effectuer pour compléter l'étude fonctionnelle des mAbs afin de distinguer des activités différentes en fonction des isotopes, de l'affinité à l'antigène, de la force de liaison à la FHA ou potentiellement de l'épitope.

Le protocole d'infection des cellules alvéolaires humaines A549 avec la souche BPSM-GFP du laboratoire, développé pour la microscopie confocale, pourra être adapté sur une lignée de cellules pulmonaires humaines non-cancéreuses, BEAS-2B, disponible au laboratoire. L'interaction antigène-anticorps pourrait être différente entre ces 2 modèles de cellules. L'étude de cellules épithéliales de septum nasal, RPMI2650, serait également intéressante à mettre en parallèle avec celle des cellules pulmonaires. Effectivement, lors d'une infection, les bactéries vont progressivement migrer vers le tractus inférieur et les anticorps anti-FHA induis suite à une infection pourraient interagir différemment entre les bactéries et les cellules épithéliales rencontrées et potentiellement exercer des activités biologiques différentes spécifiques du type cellulaire.

L'immunisation des souris avec les mAbs F3 et F8, 3h avant infection n'a pas permis de montrer un effet protecteur dans les poumons 7 jours après. Il se pourrait que la cinétique d'immunisation ne soit pas optimale. En effet, la protection médiée par ces mAbs pourrait être observée avant le jour 7 post-infection. De plus, il est possible que ces mAbs transsudent vers les muqueuses, ce qui pourraient être révélé par leur présence dans les BALF au moment de l'infection. Enfin, nous

pouvons également penser que ces mAbs seront recrutés au site d'infection, au niveau du nez. Cependant, lors de cette étude *in vivo*, nous n'avons pas examiné la colonisation nasale, et il serait également intéressant de regarder le passage mucosal des mAbs dans les sécrétions nasales.

La relevance clinique de ces mAbs pourrait s'appuyer sur l'étude d'antisérum souris FHA spécifique et de sérums polyclonaux issus d'individus convalescents ou vaccinés. Des individus convalescents produisent des anticorps anti-FHA reconnaissant la même région FHA que les anticorps produits par des individus vaccinés avec wP et aP. Toutefois les anticorps sériques des individus vaccinés aP présentent également un deuxième site de fixation sur la FHA<sup>260</sup>. Ces observations montrent que la vaccination peut avoir un impact dans la reconnaissance d'épitopes, impliquant probablement des anticorps de fonctionnalités différentes.

Dans le cadre d'une collaboration (G. Berbers, Pays-Bas), nous avons obtenus 8 surnageants purifiés de mAbs anti-PRN pour lesquels la structure de l'épitope a été déterminée<sup>303</sup>. Des résultats préliminaires sur leur activité inhibitrice testée en BGIA a montré que le seul mAb, qui reconnaissant la région R2 de la PRN, induisait une inhibition de croissance indépendamment de complément. Et l'étude d'un mAb IgG2a n'a pas montré d'activité inhibitrice complément-dépendant. L'étude de ces mAbs anti-PRN a notamment permis de montrer que les boucles présentent dans la structure de la PRN pouvaient cacher des épitopes afin de minimiser les interactions avec les anticorps<sup>304</sup>. La caractérisation de l'activité fonctionnelle et la découverte des épitope ciblés par les mAbs anti-PRN permet de mieux comprendre (1) les mécanismes protecteurs des anticorps anti-PRN<sup>105,161</sup> induits et (2) les stratégies d'échappement au système immunitaire mises en place par *B. pertussis*, à savoir le polymorphisme de PRN et l'émergence de souches circulantes déficientes en PRN. Ces souches présenteraient d'ailleurs un avantage sélectif à l'infection d'individus vaccinés aP<sup>305</sup>.

### C. La souris : un modèle classique

Lors des expériences de transfert passif de sérum immun, nous avons pu mesurer l'importance de la réponse sérique dans la protection pulmonaire, après immunisation aP et wP, et nasale, après immunisation aP. Une cinétique de protection pourrait être envisagée afin de vérifier si la protection induite est différente à des temps précoces et stable dans le temps. Des éléments de réponse sur l'identification des anticorps protecteurs pourraient être complétés avec l'identification des anticorps présents dans les lavages nasaux et broncho-alvéolaires par titration en ELISA et isotypage. Cela permettrait également de quantifier la transsudation des anticorps IgG et IgA à travers la muqueuse<sup>270</sup>. Cette

expérience serait à mettre en parallèle avec des transferts de sérum polyclonal et monoclonal antigène-spécifique afin d'identifier les antigènes responsables de cette protection et plus précisément les isotypes ou les glycoformes concernés. Une expérience de transfert passif de sérum humain vacciné aP ou de sérum humain vacciné aP aglycosylé (traitement à la PNGase), réalisée pendant la thèse, a montré une perte de l'activité protectrice du sérum transféré par voie intrapéritonéale 3h avant l'infection sur la colonisation pulmonaire à 7 jours, montrant l'impact de la glycosylation sur l'activité protectrice des anticorps.

L'utilisation en parallèle de 2 souches de souris, C57BL/6 et BALB/c, a permis de montrer une différence dans les profils de colonisation pulmonaire et nasale. Des études ont montré que les souris BALB/c comptaient moins de  $LT\gamma\delta$ , cellules productrices d'IL17, mais plus de  $LT\ CD4+$  dans la rate que les souris C57BL/6 et que les splénocytes de ces dernières sécrétaient plus d'IFN $\gamma$ <sup>271</sup>. Cette différence de population cellulaire a également un impact sur la réponse anticorps dans la mesure où la sécrétion d'IFN $\gamma$  induit un changement de classe isotypique en IgG2a et IgG3. De plus, il semblerait que la longévité, l'avidité et l'amplitude de la réponse IgG varie en fonction des souches de souris<sup>272,306</sup>. Effectivement, nos résultats ELISA ont montré une différence de réponse anticorps en termes d'amplitude, et il serait intéressant d'étudier l'avidité des anticorps sériques.

Des paramètres tels que l'avidité, l'amplitude et l'isotype des IgG et IgA dans les lavages de nez pourraient être corrélés avec les cinétiques de colonisation dans le nez, de même pour les BALF et les cinétiques de colonisation dans le poumon. Des BGIA sur les échantillons sériques pré- et post-infection ainsi que les BALF et NW post-infection pourraient être corrélés avec les paramètres précédents.

Les cinétiques de colonisation pulmonaire sont semblables entre les 2 souches de souris et les 2 doses infectieuses. Cependant les profils de colonisation nasale sont différents selon la souche de souris utilisée et selon la dose infectieuse. Différentes hypothèses peuvent être à l'origine de cette différence, notamment sur la composition des cellules immunitaires résidentes dans les NALT où s'effectue la commutation isotypique des IgA et la génération des lymphocytes Th1 et Th2. Ensuite, même si à ce jour la littérature concernant les interactions entre bactéries pathogènes et commensales dans les muqueuses aériennes supérieures est peu abondante et quasi-inexistante pour *B. pertussis*, il est possible que la flore nasale puisse jouer un rôle. En effet, une étude sur des souris C57BL/6 a montré que la flore locale avait un effet inhibiteur sur la colonisation nasale de *B. pertussis*<sup>307</sup>. Il se peut également qu'aux plus faibles doses d'infection, les bactéries s'organisent en biofilm leur permettant de coloniser plus longtemps la muqueuse respiratoire et d'échapper au système immunitaire<sup>94</sup>.

## D. Le babouin : un modèle émergent

Comme décrit au chapitre VIII.2 des résultats, les courbes d'inhibition obtenues avec les sérums de babouins sont en forme de parabole. Ce phénomène de prozone<sup>280</sup> a été attribué à un excès d'anticorps par rapport à l'antigène ou à la présence d'inhibiteurs aspécifiques observable dans les concentrations de sérum les plus élevées<sup>279</sup>. La gamme de dilution des sérums pourrait donc être ajustée à l'avenir pour diluer davantage les échantillons de sérums de babouins et limiter cet effet.

L'activité BGIA sur les sérums de babouins a révélé une forte activité inhibitrice des échantillons naïfs, comparable à celle des échantillons vaccinés. Il est à noter que ces résultats sont basés sur 2 ou 3 échantillons et peuvent être artéfactuels ou fortement liés au statut immunitaire des babouins. En effet, la présence d'IgG anti-PT et -FHA ainsi que des IgA anti-FHA et -PRN chez les babouins naïfs avant infection, peuvent être responsables de cette protection précoce. Parmi les réponses précoces du système immunitaire humoral pouvant expliquer les résultats du BGIA, les anticorps naturels IgM peuvent être une hypothèse. Ils sont sécrétés par une population de LB différenciée en type B1, capable de produire constitutivement des anticorps dits naturels sans contact antigénique préalable. Ils sont capables de reconnaître des antigènes bactériens et viraux et leur forte avidité contribuent à la mise en place d'une défense immunitaire initiale avant l'installation de la réponse immunitaire adaptative<sup>308</sup>. La présence de tels anticorps n'a cependant jamais été démontré dans le cadre d'une infection à *B. pertussis*.

La protection des babouins vaccinés avec 10<sup>9</sup> BPZE1 a été corrélée, sur 4 individus, avec la présence d'IgA anti-PRN à 3 et 4 semaines post-infection au pic de la réponse anticorps IgA. Il a été montré dans la littérature que les anticorps IgA, dénaturés par chauffage, pouvaient agréger les IgG pour former des complexes antigènes-anticorps et faciliter l'élimination de ce complexe par le complément lié aux IgG et que les structures glycosylées des IgA pouvaient interagir avec les fimbriae présents à la surface des bactéries<sup>309</sup>. L'utilisation de sérum polyclonal anti-PRN spécifique sur ces sérums permettrait de valider les résultats du BGIA sur le rôle des IgA anti-PRN.

## E. L'Homme : un modèle unique

L'étude de la vaccination maternelle aP en Thaïlande a montré une interférence dans la fonctionnalité des anticorps induits chez les enfants vaccinés avec un vaccin

wP à 19 mois mais aussi sur le taux sérique d'IgG-PT et IgG-FHA après la vaccination optimale et le rappel vaccinal. Cette interférence a été discutée en partie X.II.

Dans cette étude, l'application du BGIA a permis d'amener la dimension de la fonctionnalité des anticorps alors que les techniques classiques utilisées pour évaluer la réponse anticorps ne reposent que sur leur capacité à lier l'antigène. De plus, des corrélations entre inhibition de croissance et présence d'anticorps antigène-spécifique a permis de montrer le rôle des IgG anti-PRN dans cette fonctionnalité. Pour la première fois, le BGIA a été utilisée sur une cohorte de plus de 300 individus qui avait pour finalité une question de santé publique quant à la mise de la vaccination maternelle en Thaïlande.

L'avidité des anticorps sériques issus de cette étude pourrait être mesurée pour évaluer également l'impact de la vaccination maternelle dans le modelage de la réponse immunitaire de l'enfant. Des études sur l'impact du vaccin aP Boostrix® donnée pendant la grossesse sur l'avidité des anticorps induits suite à une vaccination aP Infanrix® des enfants, n'a montré aucune différence après l'immunisation primaire à 3 doses, mais est meilleure après le rappel vaccinal pour les IgG anti-PT chez les enfants nés de mères non-revaccinées. Ces résultats indiquent, que par des mécanismes encore inconnus, la vaccination maternelle module l'avidité des anticorps de l'enfant dont l'impact est observé tardivement<sup>310</sup>.

L'effet de l'allaitement chez des mères revaccinées pendant la grossesse sur la protection chez l'enfant est peu clair. Même si cette vaccination induit la présence de sIgA anti-PT/-PRN/-FHA dans le lait maternel<sup>311</sup>, le rôle de ces anticorps maternels absorbés pendant l'allaitement dans la protection des enfants n'est pas clairement établi.

## F. Ouverture du projet de thèse

La recrudescence des cas de coqueluche dans les pays préconisant la vaccination acellulaire et le manque de corrélat de protection a poussé la communauté *Bordetelles* à développer de nouvelles approches thérapeutiques et technologiques.

En outre, la multiplicité des modèles d'études animaux et des techniques d'analyses a permis de mettre en exergue l'importance de la réponse anticorps dans la protection à *B. pertussis*. De plus, la protection induite par les vaccins est majoritairement basée sur la réponse anticorps. Or, l'étude des déterminants antigéniques dans la littérature de *B. pertussis* ne se concentre que sur une poignée d'antigènes alors qu'il en existerait plus de 3400<sup>312</sup>. La découverte de nouveaux antigènes protecteurs est essentielle pour améliorer les vaccins acellulaires actuels. De plus, la plupart des études sur la réponse anticorps adressent peu souvent la question de la fonctionnalité des anticorps induits. Ainsi, une étude complète du « sérum réactome »<sup>313</sup> permettrait d'identifier une signature de protection, qui pourrait être multifactorielle de la réponse anticorps: affinité, avidité, isotype, glycosylation, fonction spécifique. Cette signature serait alors déterminante pour établir un corrélat de protection contre la coqueluche.

Le projet de thèse entre dans cette dynamique et a permis de renseigner l'intérêt d'étudier les déterminants antigéniques et la fonctionnalité des anticorps, un aspect peu abordé dans les études vaccinales sur *B. pertussis* et pour lequel le BGIA pourrait s'avérer utile.

En effet, pendant ces années de thèse j'ai eu l'opportunité d'intégrer le consortium européen PERISCOPE, grâce à l'originalité de mon projet et ses applications cliniques, dont l'objectif est de déterminer un corrélat de protection pour la coqueluche.

## XI. Bibliographie

1. Weston, R. Whooping Cough: A Brief History to the 19th Century. *Can. Bull. Med. Hist.* **29**, 329–349 (2012).
2. Bordet, J. & Gengou, O. Le microbe de la coqueluche. *Ann. l'Institut Pasteur J. Microbiol.* **9**, 731–741 (1906).
3. Bordet, J. & Gengou, O. Note complémentaire sur le microbe de la coqueluche. *Ann. l'Institut Pasteur J. Microbiol.* **N°9**, 720–726 (1907).
4. Porter, J. F., Connor, K. & Donachie, W. Isolation and characterization of Bordetella parapertussis-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology* **140**, 255–261 (1994).
5. Weyant, R. S. *et al.* Bordetella holmesii sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1–7 (1995).
6. Ivanov, Y. V. *et al.* Identification and taxonomic characterization of Bordetella pseudohinzii sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 5452–5459 (2016).
7. Vandamme, P. *et al.* Bordetella hinzii sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 37–45 (1995).
8. Blackall, P. J. & Farrah, J. G. Isolation of Bordetella avium from poultry. *Aust. Vet. J.* **62**, 370–372 (1985).
9. Cookson, B. T. *et al.* Bacteremia caused by a novel Bordetella species, 'B. hinzii'. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2569–2571 (1994).
10. Harrington, A. T., Castellanos, J. A., Ziedalski, T. M., Clarridge, J. E. & Cookson, B. T. Isolation of Bordetella avium and novel Bordetella strain from patients with respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 72–74 (2009).
11. Vandamme, P. A. *et al.* Bordetella bronchialis sp. nov., bordetella flabilis sp. nov. and bordetella sputigena sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of Achromobacter sediminum Zhang *et al.* 2014 as verticia sediminum gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 3674–3682 (2015).
12. Ko, K. S. *et al.* New species of bordetella, bordetella ansorpii sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2516–2519 (2005).
13. Vandamme, P. *et al.* Bordetella trematum sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of Alcaligenes denitrificans Ruger and Tan 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 849–858 (1996).
14. von Wintzingerode, F. *et al.* Bordetella petrii sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus Bordetella. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1257–1265 (2001).
15. Fry, N. K. *et al.* Bordetella petrii clinical isolate. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1131–1133 (2005).
16. Tazato, N. *et al.* Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: Bordetella muralis sp. nov., Bordetella tumulicola sp. nov. and Bordetella tumbae sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 4830–4838 (2015).
17. Soumana, I. H., Linz, B. & Harvill, E. T. Environmental origin of the genus Bordetella. *Front.*

- Microbiol.* **8**, 1–10 (2017).
18. Warfel, J. M., Beren, J. & Merkel, T. J. Airborne transmission of bordetella pertussis. *J. Infect. Dis.* **206**, 902–906 (2012).
  19. Janda, W. M. *et al.* Unexpected isolation of Bordetella pertussis from a blood culture. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2851–2853 (1994).
  20. Yeung, K. H. T., Duclos, P., Nelson, E. A. S. & Hutubessy, R. C. W. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 974–980 (2017).
  21. Hewlett, E. L. & Edwards, K. M. Pertussis — Not Just for Kids. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1215–1222 (2005).
  22. Mooi, F. R., Van Der Maas, N. A. T. & De Melker, H. E. Pertussis resurgence : waning immunity and pathogen adaptation – two sides of the same coin. *Epidemiol. Infect.* 685–694 (2014).
  23. Bart, M. J. *et al.* Comparative genomics of prevaccination and modern Bordetella pertussis strains. *BMC Genomics* **11**, 627 (2010).
  24. Mooi, F. R. *et al.* Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1206–1213 (2009).
  25. Warfel, J. M., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 787–792 (2014).
  26. Pichichero, M. E. *et al.* Safety and Immunogenicity of Six Acellular Pertussis Vaccines and One Whole-Cell Pertussis Vaccine Given as a Fifth Dose in four- to six-year-old children. *Pediatrics* **105**, (2000).
  27. Olin, P., Rasmussen, F., Gustafsson, L., Hallander, H. O. & Heijbel, H. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. *Lancet* **350**, 1569–1577 (1997).
  28. Locht, C. Will we have new pertussis vaccines? *Vaccine* **36**, 5460–5469 (2018).
  29. Mielcarek, N. *et al.* Live attenuated B. pertussis as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* **2**, 0662–0670 (2006).
  30. Kwon, H. J. *et al.* Infant pertussis and household transmission in korea. *J. Korean Med. Sci.* **27**, 1547–1551 (2012).
  31. Elliott, E. *et al.* National study of infants hospitalized with pertussis in the acellular vaccine era. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**, 246–252 (2004).
  32. Mary Healy, C., Rench, M. A., Wootton, S. H. & Castagnini, L. A. Evaluation of the impact of a pertussis cocooning program on infant pertussis infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**, 22–26 (2015).
  33. Quinn, H. E. *et al.* Parental tdap boosters and infant pertussis: A case-control study. *Pediatrics* **134**, 713–720 (2014).
  34. Gkentzi, D. *et al.* Maternal vaccination against pertussis: a systematic review of the recent literature. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* **102**, 456–463 (2017).
  35. Abu Raya, B. *et al.* The effect of timing of maternal tetanus, diphtheria, and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy on newborn pertussis antibody levels - A prospective

- study. *Vaccine* **32**, 5787–5793 (2014).
36. Munoz, F. M. *et al.* Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: A randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **311**, 1760–1769 (2014).
  37. Maertens, K. *et al.* Pertussis vaccination during pregnancy in Belgium : Results of a prospective controlled cohort study. **34**, 142–150 (2016).
  38. Feunou, P. F., Mielcarek, N. & Locht, C. Reciprocal interference of maternal and infant immunization in protection against pertussis. *Vaccine* **34**, 1062–1069 (2016).
  39. Warfel, J. M., Papin, J. F., Wolf, R. F., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Maternal and neonatal vaccination protects newborn baboons from pertussis infection. *J. Infect. Dis.* **210**, 604–610 (2014).
  40. Knuf, M. *et al.* Neonatal Vaccination with an Acellular Pertussis Vaccine Accelerates the Acquisition of Pertussis Antibodies in Infants. *J. Pediatr.* **152**, (2008).
  41. Aase, A. *et al.* Immunization of Teenagers with a Fifth Dose of Reduced DTaP-IPV Induces High Levels of Pertussis Antibodies with a Significant Increase in Opsonophagocytic Activity. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 1269–1274 (2011).
  42. Edelman, K. *et al.* Local reactions and IgE antibodies to pertussis toxin after acellular diphtheria-tetanus-pertussis immunization. *Eur. J. Pediatr.* **158**, 989–994 (1999).
  43. Klein, N. P., Bartlett, J., Rowhani-Rahbar, A., Fireman, B. & Baxter, R. Waning Protection after Fifth Dose of Acellular Pertussis Vaccine in Children. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1012–1019 (2012).
  44. De Gouw, D. *et al.* Proteomics-identified Bvg-activated autotransporters protect against *Bordetella pertussis* in a mouse model. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
  45. Oliver, D. C. & Fernandez, R. C. Antibodies to BrkA augment killing of *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **20**, 235–241 (2001).
  46. Asokanathan, C., Corbel, M. & Xing, D. A CpG-containing oligodeoxynucleotide adjuvant for acellular pertussis vaccine improves the protective response against *Bordetella pertussis*. *Hum. Vaccines Immunother.* **9**, 325–331 (2013).
  47. Misiak, A. *et al.* Addition of a TLR7 agonist to an acellular pertussis vaccine enhances Th1 and Th17 responses and protective immunity in a mouse model. *Vaccine* **35**, (2017).
  48. Dias, W. O. *et al.* An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum. Vaccines Immunother.* **9**, 339–348 (2013).
  49. Thorstensson, R. *et al.* A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine-BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One* **9**, (2014).
  50. Feunou, P. F., Bertout, J. & Locht, C. T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against parapertussis. *PLoS One* **5**, (2010).
  51. Skerry, C. M. & Mahon, B. P. A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides long-term protection against virulent challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 187–193 (2011).
  52. Locht, C. *et al.* Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against *Bordetella pertussis* Disease and Infection. *J. Infect. Dis.* **216**, 117–124 (2017).

53. Cauchi, S. & Loch, C. Non-specific Effects of Live Attenuated Pertussis Vaccine Against Heterologous Infectious and Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **9**, 2872 (2018).
54. Muller, F.-M. C., Hoppe, J. E. & Wirsing von Konig, C.-H. Laboratory Diagnosis of Pertussis : State of the Art in 1997. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2435–2443 (1997).
55. Aoyama, T., Sunakawa, K., Iwata, S., Takeuchi, Y. & Fujii, R. Efficacy of short-term treatment of pertussis with clarithromycin and azithromycin. *J. Pediatr.* **129**, 761–764 (1996).
56. Lewis, K. *et al.* Pertussis caused by an erythromycin-resistant strain of bordetella pertussis. *Pediatric Infectious Disease Journal* **14**, 388–391 (1995).
57. Korgenski, E. K. & Daly, J. A. Surveillance and detection of erythromycin resistance in Bordetella pertussis isolates recovered from a pediatric population in the intermountain west region of the United States. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2989–2991 (1997).
58. Shahcheraghi, F. *et al.* The first macrolide-resistant Bordetella pertussis strains isolated from Iranian patients. *Jundishapur J. Microbiol.* **7**, 1–5 (2014).
59. Guillot, S. *et al.* Macrolide-resistant bordetella pertussis infection in newborn girl, France. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 966–968 (2012).
60. Wang, Z. *et al.* High prevalence of erythromycin-resistant Bordetella pertussis in Xi'an, China. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O825–O830 (2014).
61. Liu, X. *et al.* Pertussis Outbreak in a Primary School in China. Infection and Transmission of the Macrolide-resistant Bordetella pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **37**, 145–148 (2018).
62. Yang, Y. *et al.* Variation in bordetella pertussis susceptibility to erythromycin and virulence-related genotype changes in China (1970-2014). *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
63. de Gouw, D., Diavatopoulos, D. A., Bootsma, H. J., Hermans, P. W. M. & Mooi, F. R. Pertussis: A matter of immune modulation. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 441–474 (2011).
64. Chen, Q. & Stibitz, S. The BvgASR virulence regulon of Bordetella pertussis. *Curr. Opin. Microbiol.* **47**, 74–81 (2019).
65. Coutte, L. *et al.* The multifaceted RisA regulon of Bordetella pertussis. *Sci. Rep.* **13**, (2016).
66. Jungnitz, H., West, N. P. & Walker, M. J. A Second Two-Component Regulatory System of Bordetella bronchiseptica Required for Bacterial Resistance to Oxidative Stress , Production of Acid Phosphatase , and In Vivo Persistence. *Infect. Immun.* **66**, 4640–4650 (1998).
67. Lacey, B. W. Antigenic modulation of Bordetella pertussis. *J. Hyg. (Lond).* **58**, 57–93 (1960).
68. Melton, A. R. & Weiss, A. A. Environmental Regulation of Expression of Virulence Determinants in Bordetella pertussis. *J. Bacteriol.* **171**, 6206–6212 (1989).
69. Cotter, P. A. & Miller, J. F. A mutation in the Bordetella bronchiseptica bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation , and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol. Microbiol.* **24**, 671–685 (1997).
70. Cummings, C. A., Bootsma, H. J., Relman, D. A. & Miller, J. F. Species- and Strain-Specific Control of a Complex , Flexible Regulon by Bordetella BvgAS. *J. Bacteriol.* **188**, 1775–1785 (2006).
71. Nasso, M. *et al.* Genetically Detoxified Pertussis Toxin Induces Th1/Th17 Immune Response through MAPKs and IL-10-Dependent Mechanisms. *J. Immunol.* **183**, 1892–1899 (2009).
72. Carbonetti, N. H. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease.

*Pathog. Dis.* **73**, ftv073 (2015).

73. Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Mays, R. M. & Worthington, Z. E. V. Pertussis Toxin Plays an Early Role in Respiratory Tract Colonization by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **71**, 6358–6366 (2003).
74. Spangrude, G. J., Sacchi, F., Hill, H. R., van Epps, D. E. & Daynes, R. A. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J. Immunol.* **135**, 4135–4143 (1985).
75. Samore, M. H. & Siber, G. R. Pertussis toxin enhanced IgG1 and IgE responses to primary tetanus immunization are mediated by interleukin-4 and persist during secondary responses to tetanus alone. *Vaccine* **14**, 290–297 (1996).
76. Guermonprez, P. *et al.* The Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis* Binds to Target Cells via the  $\alpha$ Mb2 Integrin (CD11b / CD18). *J Exp Med* **193**, 1035–1044 (2001).
77. Pearson, R. D., Symes, P., Conboy, M., Weiss, A. A. & Hewlett, E. L. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J. Immunol.* **139**, 2749–2754 (1987).
78. Fedele, G., Schiavoni, I., Adkins, I., Klimova, N. & Sebo, P. Invasion of dendritic cells, macrophages and neutrophils by the *Bordetella* adenylate cyclase toxin: A subversive move to fool host immunity. *Toxins (Basel)*. **9**, (2017).
79. Ross, P. J., Lavelle, E. C., Mills, K. H. G. & Boyd, A. P. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infect. Immun.* **72**, 1568–1579 (2004).
80. Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Andreasen, C. & Bushar, N. Pertussis Toxin and Adenylate Cyclase Toxin Provide a One-Two Punch for Establishment of. *Infect. Immun.* **73**, 2698–2703 (2005).
81. Khelef, N., Zychlinsky, A. & Guiso, N. *Bordetella pertussis* Induces Apoptosis. *Infect. Immun.* **61**, 4064–4071 (1993).
82. Weingart, C. L., Mobberley-Schuman, P. S., Hewlett, E. L., Gray, M. C. & Weiss, A. A. Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect. Immun.* **68**, 7152–7155 (2000).
83. Hasan, S. *et al.* *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Disrupts Functional Integrity of Bronchial Epithelial Layers. *Infect Immun.* **86**, (2018).
84. Zaretzky, F. R., Gray, M. C. & Hewlett, E. L. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: A role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol. Microbiol.* **45**, 1589–1598 (2002).
85. Parton, R. Effect of anti-inflammatory agents on the haemorrhagic response of mouse skin to *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. *J. Med. Microbiol.* **21**, 265–270 (1986).
86. Wilson, R. *et al.* Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. *Infect. Immun.* **59**, 337–345 (1991).
87. Cundell, D. R. *et al.* Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infect. Immun.* **62**, 639–643 (1994).
88. Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* **20**, 5040–5048 (2001).

89. Mazar, J. & Cotter, P. A. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* **62**, 641–654 (2006).
90. Villarino Romero, R., Osicka, R. & Sebo, P. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: a key adhesin with immunomodulatory properties? *Futur. Microbiol* **9**, 1339–1360 (2014).
91. Mooi, F. R. *et al.* Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb. Pathog.* **12**, 127–135 (1992).
92. Geuijen, C. A. W. *et al.* Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect. Immun.* **65**, 4222–4228 (1997).
93. Menozzi, F. D. *et al.* Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **62**, 769–778 (1994).
94. Serra, D. O. *et al.* FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One* **6**, (2011).
95. Ishibashi, Y., Relman, D. a & Nishikawa, A. Invasion of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence and alpha5beta1 integrin. *Microb. Pathog.* **30**, 279–288 (2001).
96. Ishibashi, Y. & Nishikawa, A. *Bordetella pertussis* infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin. *Microb Pathog* **33**, 115–125 (2002).
97. Ishibashi, Y., Claus, S. & Relman, D. A. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **180**, 1225–1233 (1994).
98. Lamberti, Y., Hayes, J. A., Vidakovics, M. L. P. & Rodriguez, M. E. Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **56**, 143–50 (2009).
99. Vidakovics, M. L. A. P., Lamberti, Y., Pol, W. Van Der, Yantorno, O. & Rodriguez, M. E. Adenylate cyclase influences filamentous haemagglutinin-mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**, 140–147 (2006).
100. Abramson, T., Kedem, H. & Relman, D. A. Proinflammatory and proapoptotic activities associated with *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.* **69**, 2650–2658 (2001).
101. Mobberley-Schuman, P. S., Connelly, B. & Weiss, A. a. Phagocytosis of *Bordetella pertussis* incubated with convalescent serum. *J. Infect. Dis.* **187**, 1646–53 (2003).
102. Geuijen, C. A. W. *et al.* Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **66**, 2256–2263 (1998).
103. Hazenbos, W. L. W., Geuijen, C. A. W., Van den Berg, B. M., Mooi, F. R. & Van Furth, R. *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit fimD. *J. Infect. Dis.* **171**, 924–929 (1995).
104. Hazenbos, W. L., Van Den Berg, B. M., Geuijen, C. W., Mooi, F. R. & Van Furth, R. Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J. Immunol.* **155**, 3972–3978 (1995).
105. Storsaeter, J., Hallander, H. O., Gustafsson, L. & Olin, P. Levels of anti-pertussis antibodies

- related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **16**, 1907–1916 (1998).
106. Roberts, M. *et al.* Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein. *Mol. Microbiol.* **5**, 1393–1404 (1991).
  107. Bassinet, L. *et al.* Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **68**, 1934–1941 (2000).
  108. Inatsuka, C. S. *et al.* Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect. Immun.* **78**, 2901–2909 (2010).
  109. Finn, T. M. & Stevens, L. A. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol. Microbiol.* **16**, 625–634 (1995).
  110. Harvill, E. T. *et al.* Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect. Immun.* **68**, 6720–6728 (2000).
  111. Schaeffer, L. M., McCormack, F. X., Wu, H. & Weiss, A. A. Interactions of pulmonary collectins with *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide elucidate the structural basis of their antimicrobial activities. *Infect. Immun.* **72**, 7124–7130 (2004).
  112. Higgins, S. C. *et al.* Toll-Like Receptor 4-Mediated Innate IL-10 Activates Antigen-Specific Regulatory T Cells and Confers Resistance to *Bordetella pertussis* by Inhibiting Inflammatory Pathology. *J. Immunol.* **171**, 3119–3127 (2003).
  113. Barnes, M. G. & Weiss, A. A. BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect. Immun.* **69**, 3067–3072 (2001).
  114. Weiss, A. A. & Mary Goodwin, M. S. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect. Immun.* **57**, 3757–3764 (1989).
  115. Elder, K. D. & Harvill, E. T. Strain-dependent role of BrkA during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract. *Infect. Immun.* **72**, 5919–5924 (2004).
  116. Marr, N. *et al.* Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* **26**, 4306–4311 (2008).
  117. Marr, N., Shah, N. R., Lee, R., Kim, E. J. & Fernandez, R. C. *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One* **6**, (2011).
  118. Hovingh, E. S. *et al.* Virulence associated gene 8 of *Bordetella pertussis* enhances contact system activity by inhibiting the regulatory function of complement regulator C1 inhibitor. *Front. Immunol.* **9**, 1–11 (2018).
  119. Fennelly, N. K. *et al.* *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect. Immun.* **76**, 1257–1266 (2008).
  120. Mishra, M., Parise, G., Jackson, K. D., Wozniak, D. J. & Deora, R. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J. Bacteriol.* **187**, 1474–1484 (2005).
  121. Parise, G., Mishra, M., Itoh, Y., Romeo, T. & Deora, R. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J. Bacteriol.* **189**, 750–760 (2007).
  122. Conover, M. S., Loan, G. P., Love, C. F., Sukumar, N. & Deora, R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol. Microbiol.* **77**, 1439–1455 (2010).

123. Sato, S. & Kiyono, H. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 225–232 (2012).
124. Waterer, G. W. Airway Defense Mechanisms. *Clin. Chest Med.* **33**, 199–209 (2012).
125. Higgs, R., Higgins, S. C., Ross, P. J. & Mills, K. H. G. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* **5**, 485–500 (2012).
126. Wendelboe, A. M., Van Rie, A., Salmaso, S. & Englund, J. A. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, S58-61 (2005).
127. Wearing, H. J. & Rohani, P. Estimating the duration of pertussis immunity using epidemiological signatures. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
128. Dunne, A. *et al.* Inflammasome Activation by Adenylate Cyclase Toxin Directs Th17 Responses and Protection against *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* **185**, 1711–1719 (2010).
129. McGuirk, P., McCann, C. & Mills, K. H. G. Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **195**, 221–231 (2002).
130. Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Van Rooijen, N. & Ayala, V. I. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect. Immun.* **75**, 1713–1720 (2007).
131. Lamberti, Y. A., Hayes, J. A., Perez Vidakovics, M. L., Harvill, E. T. & Rodriguez, M. E. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* **78**, 907–913 (2010).
132. Mahon, B. P. & Mills, K. H. G. Interferon- $\gamma$  mediated immune effector mechanisms against *Bordetella pertussis*. *Immunol. Lett.* **68**, 213–217 (1999).
133. Higgins, S. C., Jarnicki, A. G., Lavelle, E. C. & Mills, K. H. G. TLR4 Mediates Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to *Bordetella pertussis*: Role of IL-17-Producing T Cells. *J. Immunol.* **177**, 7980–7989 (2006).
134. Andreasen, C. & Carbonetti, N. H. Role of neutrophils in response to *bordetella pertussis* infection in mice. *Infect. Immun.* **77**, 1182–1188 (2009).
135. Byrne, P., McGuirk, P., Todryk, S. & Mills, K. H. G. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2579–2588 (2004).
136. Ryan, M. *et al.* *Bordetella pertussis* respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. *J. Infect. Dis.* **112**, 1246–50 (1997).
137. Mahon, B. P., Sheahan, B. J., Griffin, F., Murphy, G. & Mills, K. H. G. Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of Mice with Targeted Disruptions of Interferon- $\gamma$  Receptor or immunoglobulin u chain genes. *J Exp Med* **186**, 1843–1851 (1997).
138. Fernandez, R. C. & Weiss, A. A. Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1041–1043 (1996).
139. Elahi, S. *et al.* The Host Defense Peptide Beta-Defensin 1 Confers Protection against *Bordetella pertussis* in Newborn Piglets. *Infect. Immun.* **74**, 2338–2352 (2006).
140. Thiriard, A., Raze, D. & Loch, C. Diversion of complement-mediated killing by *Bordetella*. *Microbes Infect.* **20**, 512–520 (2018).
141. McGuinness, A. C., Stokes, J. J. & Mudd, S. The clinical uses of serums preserved by the lyophile

- process. *J. Clin. Invest.* **16**, 185–196 (1937).
142. Mills, K. H. G., Ryan, M., Ryan, E. & Mahon, B. P. A Murine Model in Which Protection Correlates with Pertussis Vaccine Efficacy in Children Reveals Complementary Roles for Humoral and Cell-Mediated Immunity in Protection against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **66**, 594–602 (1998).
  143. Hendriks, L. H. *et al.* Different IgG-subclass distributions after whole-cell and acellular pertussis infant primary vaccinations in healthy and pertussis infected children. *Vaccine* **29**, 6874–6880 (2011).
  144. Nagel, J. & Poot-Scholten, E. J. Serum IgA antibody to *Bordetella pertussis* as an indicator of infection. *J. Med. Microbiol.* **16**, 417–426 (1983).
  145. Tuomanen, E. I., Zapiain, L. A., Galvan, P. & Hewlett, E. L. Characterization of antibody inhibiting adherence of *Bordetella pertussis* to human respiratory epithelial cells. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 167–170 (1984).
  146. Hellwig, S. M. M., Van Spruiel, A. B., Schellekens, J. F. P., Mooi, F. R. & Van de Winkel, J. G. J. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infect. Immun.* **69**, 4846–4850 (2001).
  147. Wolfe, D. N., Kirimanjesswara, G. S., Goebel, E. M. & Harvill, E. T. Comparative role of immunoglobulin A in protective immunity against the *Bordetellae*. *Infect. Immun.* **75**, 4416–4422 (2007).
  148. Solans, L. *et al.* IL-17-dependent SIgA-mediated protection against nasal *Bordetella pertussis* infection by live attenuated BPZE1 vaccine. *Mucosal Immunol.* **11**, 1753–1762 (2018).
  149. Ross, P. J. *et al.* Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
  150. Warfel, J. M., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Comparison of three whole-cell pertussis vaccines in the baboon model of pertussis. *Clin. Vaccine Immunol.* **23**, 47–54 (2016).
  151. Ryan, M. *et al.* Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology* **93**, 1–10 (1998).
  152. Dirix, V. *et al.* Cytokine and antibody profiles in 1-year-old children vaccinated with either acellular or whole-cell pertussis vaccine during infancy. *Vaccine* **27**, 6042–6047 (2009).
  153. Mascart, F. *et al.* Modulation of the infant immune responses by the first pertussis vaccine administrations. **25**, 391–398 (2007).
  154. Ryan, E. J., Nilsson, L., Kjellman, N. I. M., Gothefors, L. & Mills, K. H. G. Booster immunization of children with an acellular pertussis vaccine enhances Th2 cytokine production and serum IgE responses against pertussis toxin but not against common allergens. *Clin. Exp. Immunol.* **121**, 193–200 (2000).
  155. Schure, R. M. *et al.* Differential T- and B-cell responses to pertussis in acellular vaccine-primed versus whole-cell vaccine-primed children 2 years after preschool acellular booster vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* **20**, 1388–1395 (2013).
  156. Hendriks, L. H. *et al.* Identifying long-term memory B-cells in vaccinated children despite waning antibody levels specific for *Bordetella pertussis* proteins. *Vaccine* **29**, 1431–1437 (2011).
  157. Wilk, M. M. *et al.* Lung CD4 Tissue-Resident Memory T Cells Mediate Adaptive Immunity

- Induced by Previous Infection of Mice with *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* **199**, 233–243 (2017).
158. Wilk, M. M. *et al.* Immunization with whole cell but not acellular pertussis vaccines primes CD4 T RM cells that sustain protective immunity against nasal colonization with *Bordetella pertussis*. *Emerg. Microbes Infect.* **8**, 169–185 (2019).
  159. Taranger, J. *et al.* Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis. *J. Infect. Dis.* **181**, 1010–1013 (2000).
  160. Hellwig, S. M. M., Rodriguez, M. E., Berbers, G. A. M., van de Winkel, J. G. J. & Mooi, F. R. Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J. Infect. Dis.* **188**, 738–42 (2003).
  161. Cherry, J. D., Gornbein, J., Heininger, U. & Stehr, K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* **16**, 1901–1906 (1998).
  162. Storsaeter, J. & Olin, P. Relative efficacy of two acellular pertussis vaccines during three years of passive surveillance. *Vaccine* **10**, 142–144 (1992).
  163. Warfel, J. M., Beren, J., Kelly, V. K., Lee, G. & Merkel, T. J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* **80**, 1530–1536 (2012).
  164. Pinto, M. V. & Merkel, T. J. Pertussis disease and transmission and host responses: insights from the baboon model of pertussis. *J. Infect.* **74**, S114–S119 (2017).
  165. Naninck, T., Coutte, L., Mayet, C., Contreras, V. & Loch, C. In vivo imaging of bacterial colonization of the lower respiratory tract in a baboon model of *Bordetella pertussis* infection and transmission. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
  166. Shearer, M. H., Dark, R. D., Chodosh, J. & Kennedy, R. C. Comparison and characterization of immunoglobulin G subclasses among primate species. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 953–958 (1999).
  167. Kaufmann, S. H. E. Immunology's foundation: The 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat. Immunol.* **9**, 705–712 (2008).
  168. Bordet, J. Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. *Ann. l'Institut Pasteur J. Microbiol.* **5**, 257–296 (1900).
  169. Hirsch, J. G. Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. *Bacteriol. Rev.* **23**, 48–60 (1959).
  170. Fagraeus, A. Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *Nature* **159**, 499 (1947).
  171. Burnet, F. M. A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production using the Concept of Clonal Selection. *CA. Cancer J. Clin.* **26**, 119–121 (1976).
  172. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575–581 (1983).
  173. Tomasi, T. B. The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. *Immunol. Today* **13**, 416–418 (1992).
  174. Rowe, D. S. & Fahey, J. L. A new class of human immunoglobulins. *J. Exp. Med.* **121**, 185–199 (1965).
  175. Ishizaka, K. & Ishizaka, T. Physicochemical properties of reaginic antibody. *J. Allergy* **37**, 169–185 (1966).

176. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
177. Williams, A. F. A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunol. Today* **8**, 298–303 (1987).
178. Nelson, A. Antibody fragments: Hope and hype. *MAbs* **2**, 77–83 (2010).
179. Johansen, F. E., Braathen, R. & Brandtzaeg, P. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand. J. Immunol.* **52**, 240–248 (2000).
180. Kaetzel, C. S., Robinson, J. K., Chintalacharuvu, K. R., Vaerman, J. P. & Lamm, M. E. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: A local defense function for IgA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8796–8800 (1991).
181. Behn, U. Idiotypic networks : toward a renaissance ? *Immunol. Rev.* **216**, 142–152 (2007).
182. Jerne, N. K. The generative grammar of the immune system. *EMBO J.* **4**, 847–852 (2000).
183. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG subclasses and allotypes : from structure to effector functions. *J. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).
184. Granoff, D. M. *et al.* Response to Immunization with Haemophilus influenzae Type b Polysaccharide-Pertussis Vaccine and Risk of Haemophilus Meningitis in Children with the Km ( 1 ) immunoglobulin allotype. *J. Clin. Invest.* **74**, 1708–1714 (1984).
185. Ambrosino, D. M. *et al.* Correlation between G2m (n) Immunoglobulin Allotype and Human Antibody Response and Susceptibility to Polysaccharide Encapsulated Bacteria. *J. Clin. Invest.* **75**, 1935–1942 (1985).
186. Fouda, G. G., Martinez, D. R., Swamy, G. K. & Permar, S. R. The Impact of IgG transplacental transfer on early life immunity. *immunohorizons* **2**, 14–25 (2018).
187. Jefferis, R. & Kumararatne, D. S. Selective IgG subclass deficiency : quantification and clinical relevance. *Clin. Exp. Immunol.* **81**, 357–367 (1990).
188. Brekke, O., Michaelsen, T., Sandin, R. & Sandie, I. Activation of complement by an IgG molecule without a genetic hinge. *Nature* **363**, 628–630 (1993).
189. Van Egmond, M. *et al.* IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* **22**, 205–211 (2001).
190. Woof, J. M. & Ken, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* **208**, 270–282 (2006).
191. Roos, A. *et al.* Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *J. Immunol.* **167**, 2861–2868 (2001).
192. Hiemstra, P. S., Gorter, A., Stuurman, M. E., Van Es, L. A. & Daha, M. R. Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur. J. Immunol.* **17**, 321–326 (1987).
193. Blandino, R. & Baumgarth, N. Secreted IgM: New tricks for an old molecule. *J. Leukoc. Biol.* **106**, 1021–1034 (2019).
194. Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 251–263 (2011).
195. Methot, S. P. & Di Noia, J. M. *Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. Advances in Immunology* **133**, (2017).

196. Moens, L. & Tangye, S. G. Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation : IL-21 takes center stage. *J. Immunol.* **5**, 1–13 (2014).
197. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. & Dwek, R. A. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 21–50 (2007).
198. Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R. & Sondermann, P. Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. *J. Mol. Biol.* **325**, 979–989 (2003).
199. Ferrara, C. *et al.* Unique carbohydrate – carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc  $\gamma$  RIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12669–12674 (2011).
200. Thomann, M., Reckermann, K., Reusch, D., Prasser, J. & Tejada, M. L. Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. *Mol. Immunol.* **73**, 69–75 (2016).
201. van de Bovenkamp, F. S., Hafkenschied, L., Rispens, T. & Rombouts, Y. The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *J. Immunol.* **196**, 1435–1441 (2016).
202. Gunn, B. M. & Alter, G. Modulating Antibody Functionality in Infectious Disease and Vaccination. *Trends Mol. Med.* **22**, 969–982 (2016).
203. Forthal, D. Functions of Antibodies. *Microbiol. Spectr.* **2**, 1–17 (2014).
204. Horton, R. E. & Vidarsson, G. Antibodies and their receptors: Different potential roles in mucosal defense. *Front. Immunol.* **4**, 1–12 (2013).
205. Pyzik, M. *et al.* The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Front. Immunol.* **10**, (2019).
206. Kubagawa, H. *et al.* Identity of the elusive IgM Fc receptor (Fc $\mu$ R) in humans. *J. Exp. Med.* **206**, 2779–2793 (2009).
207. Jaffar, Z., Ferrini, M., Girtsman, T. & Roberts, K. Antigen-specific Treg regulate Th17-mediated lung neutrophilic inflammation, B-cell recruitment and polymeric IgA and IgM levels in the airways. *Eur. J. Immunol.* **39**, 3307–3314 (2009).
208. Weisbart, R. H., Kacena, A., Schuh, A. & Goldet, D. W. GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis. *Nature* **332**, 14–15 (1988).
209. Shen, L. *et al.* Presentation of ovalbumin internalized via the immunoglobulin-A Fc receptor is enhanced through Fc receptor g-chain signaling. *Immunobiology* **97**, 205–213 (2001).
210. Pasquier, B. *et al.* Identification of Fc $\alpha$ RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: Dual role of FcR $\gamma$  ITAM. *Immunity* **22**, 31–42 (2005).
211. Sutton, B. J. & Davies, A. M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: Fc $\epsilon$ RI and CD23/Fc $\epsilon$ RII. *Immunol. Rev.* **268**, 222–235 (2015).
212. Lakshmi Tamma, S. M., Wu, Y., Toporovsky, I., Lima, V. & Coico, R. F. IgD receptor-mediated signal transduction in T cells. *Cell. Immunol.* **207**, 110–117 (2001).
213. Gómez Román, V. R., Murray, J. C. & Weiner, L. M. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). *Antib. Fc Link. Adapt. Innate Immun.* 1–27 (2014).
214. Piacenza, L., Trujillo, M. & Radi, R. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *J. Exp. Med.* **216**, 501–516 (2019).

215. Günther, J. & Seyfert, H. M. The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. *Semin. Immunopathol.* **40**, 555–565 (2018).
216. Hellwig, S. M. M. *et al.* Targeting to Fc $\gamma$  Receptors, But Not CR3 (CD11b / CD18), Increases Clearance of *Bordetella pertussis*. *J. Infect. Dis.* **183**, 871–879 (2001).
217. Rodriguez, M. E. *et al.* Fc Receptor-Mediated Immunity Against *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* **167**, 6545–6551 (2001).
218. Hovingh, E. S. *et al.* Detection of opsonizing antibodies directed against a recently circulating *Bordetella pertussis* strain in paired plasma samples from symptomatic and recovered pertussis patients. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
219. Aase, A. *et al.* Opsonophagocytic activity and other serological indications of *Bordetella pertussis* infection in military recruits in Norway. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 855–862 (2007).
220. Schneemann, A. & Manchester, M. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol.* **4**, 35–43 (2009).
221. Leav, B. A. *et al.* Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI). *Vaccine* **28**, 965–969 (2010).
222. Karau, M. J. *et al.* Passive therapy with humanized anti-staphylococcal enterotoxin B antibodies attenuates systemic inflammatory response and protects from lethal pneumonia caused by staphylococcal enterotoxin B-producing *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **8**, 1148–1159 (2017).
223. Jensen, M. A., Wang, Y.-Y., Lai, S. K., Forest, M. G. & McKinley, S. A. Antibody-Mediated Immobilization of Virions in Mucus. *Bull. Math. Biol.* **81**, 4069–4099 (2019).
224. Campodónico, V. L. *et al.* Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. *Infect. Immun.* **78**, 746–755 (2010).
225. Bidhendi, S. M. *et al.* Blocking adherence of uropathogenic *Escherichia coli* isolate to HEP-2 cells and bladder of mice in the presence of antibody against p-fimbriae. *Biologicals* **35**, 99–105 (2007).
226. Edelson, B. T. & Unanue, E. R. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity* **14**, 503–512 (2001).
227. LaRocca, T. J., Katona, L. I., Thanassi, D. G. & Benach, J. L. Bactericidal Action of a Complement-Independent Antibody against Relapsing Fever *Borrelia* Resides in Its Variable Region. *J. Immunol.* **180**, 6222–6228 (2008).
228. Hewlett, E. L., Sauer, K. T., Myers, G. A., Cowell, J. L. & Guerrant, R. L. Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect. Immun.* **40**, 1198–1203 (1983).
229. Dalby, T., Sørensen, C., Petersen, J. W. & Kroghfelt, K. A. Pertussis serology: Assessment of IgG anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. *Apmis* **118**, 968–972 (2010).
230. Millen, S. H. *et al.* Antibody-Mediated Neutralization of Pertussis Toxin-Induced Mitogenicity of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Infect. Immun.* **72**, 615–620 (2004).
231. Sato, H., Sato, Y. & Ohishi, I. Comparison of pertussis toxin (PT)-neutralizing activities and mouse-protective activities of anti-PT mouse monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **59**, 3832–3835 (1991).
232. Mink, C. M., O'Brien, C. H., Wassilak, S., Deforest, A. & Meade, B. D. Isotype and antigen specificity of pertussis agglutinins following whole-cell pertussis vaccination and infection with

- Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **62**, 1118–1120 (1994).
233. Van Den Berg, B. M., Beekhuizen, H., Mooi, F. R. & Van Furth, R. Role of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**, 1050–1055 (1999).
234. Brookes, C. *et al.* *Bordetella pertussis* isolates vary in their interactions with human complement components article. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, (2018).
235. Barnes, M. G. & Weiss, A. A. Activation of the complement cascade by *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 271–275 (2003).
236. Mountzouros, K. T., Kimura, A. & Cowell, J. L. A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis* reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with *B. pertussis*. *Infect. Immun.* **60**, 5316–5318 (1992).
237. Weiss, A. A., Mobberley, P. S. & Fernandez, R. C. Characterization of Human Bactericidal Antibodies to *Bordetella pertussis*. **67**, 1424–1431 (1999).
238. Esposito, S. *et al.* Pertussis prevention: Reasons for resurgence, and differences in the current acellular pertussis vaccines. *Front. Immunol.* **10**, 1–11 (2019).
239. Nguyen, A. W. *et al.* A cocktail of humanized anti-pertussis toxin antibodies limits disease in murine and baboon models of whooping cough. *Sci. Transl. Med.* **7**, 1–21 (2015).
240. Eby, J. C., Gray, M. C., Warfel, J. M., Merkel, T. J. & Hewlett, E. L. Use of a toxin neutralization assay to characterize the serologic response to adenylate cyclase toxin after infection with *bordetella pertussis*. *Clin. Vaccine Immunol.* **24**, 1–11 (2017).
241. Zanaboni, E., Arato, V., Pizza, M., Seubert, A. & Leuzzi, R. A novel high-throughput assay to quantify the vaccine-induced inhibition of *Bordetella pertussis* adhesion to airway epithelia. *BMC Microbiol.* **16**, 215 (2016).
242. Miyashita, N., Kawai, Y., Yamaguchi, T. & Ouchi, K. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection in adolescents and adults. *Respirology* **16**, 1189–1195 (2011).
243. Kamano, H. *et al.* Analysis of *Bordetella pertussis* agglutinin titers during an outbreak of pertussis at a university in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **63**, 108–112 (2010).
244. Fernandez, R. C. & Weiss, A. A. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect. Immun.* **62**, 4727–4738 (1994).
245. Kubler-Kielb, J. *et al.* Oligosaccharide conjugates of *Bordetella pertussis* and bronchiseptica induce bactericidal antibodies, an addition to pertussis vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4087–4092 (2011).
246. McIntosh, E. D. G., Bröker, M., Wassil, J., Welsch, J. A. & Borrow, R. Serum bactericidal antibody assays - The role of complement in infection and immunity. *Vaccine* **33**, 4414–4421 (2015).
247. Weingart, C. L. *et al.* Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect. Immun.* **67**, 4264–4267 (1999).
248. Zanaboni, E., Arato, V., Pizza, M., Seubert, A. & Leuzzi, R. A novel high-throughput assay to quantify the vaccine-induced inhibition of *Bordetella pertussis* adhesion to airway epithelia. *BMC Microbiol.* **16**, 1–7 (2016).
249. McIntosh, E. D. G., Bröker, M., Wassil, J., Welsch, J. A. & Borrow, R. Serum bactericidal antibody assays - The role of complement in infection and immunity. *Vaccine* **33**, 4414–4421 (2015).

250. Dolby, J. M. The antibacterial effect of *Bordetella pertussis* antisera. *Immunology* **8**, 484–498 (1965).
251. Weiss, A. A., Mobberley, P. S., Fernandez, R. C. & Mink, C. M. Characterization of human bactericidal antibodies to *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **67**, 1424–1431 (1999).
252. Archambault, D., Rondeau, P., Martin, D. & Brodeur, B. R. Characterization and comparative bactericidal activity of monoclonal antibodies to *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide A. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 905–11 (1991).
253. Ackers, J. P. & Dolby, J. M. The antigen of *Bordetella pertussis* that induces bactericidal antibody and its relationship to protection of mice. *J Gen Microbiol* **70**, 371–382 (1972).
254. Weiss, A. A. *et al.* Acellular Pertussis Vaccines and Complement Killing of *Bordetella pertussis*. **72**, 7346–7351 (2004).
255. Barnes, M. G. & Weiss, A. Growth Phase Influences Complement Resistance of *Bordetella pertussis* Growth Phase Influences Complement Resistance of *Bordetella pertussis*. **70**, 403–406 (2002).
256. Nakamura, M. M. *et al.* Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **74**, 5537–5548 (2006).
257. Archambault, D., Rondeau, P., Martin, D. & Brodeur, B. R. Characterization and comparative bactericidal activity of monoclonal antibodies to *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide A. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 905–11 (1991).
258. Shahin, R. D., Hamel, J., Leef, M. F. & Brodeur, B. R. Analysis of protective and nonprotective monoclonal antibodies specific for *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide. *Infect. Immun.* **62**, 722–725 (1994).
259. Leininger, E., Probst, P. G., Brennan, M. J. & Kenimer, J. G. Inhibition of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin-mediated cell adherence with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett* **106**, 31–38 (1993).
260. Leininger, E. *et al.* Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis* vaccine component filamentous hemagglutinin. *J. Infect. Dis.* **175**, 1423–31 (1997).
261. Loch, C., Geoffroy, M. C. & Renaud, G. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J.* **11**, 3175–83 (1992).
262. Barkoff, A. M. *et al.* A rapid ELISA-based method for screening *Bordetella pertussis* strain production of antigens included in current acellular pertussis vaccines. *J. Immunol. Methods* **408**, 142–148 (2014).
263. Sato, H., Ito, A., Chiba, J. & Sato, Y. Monoclonal antibody against pertussis toxin: Effect on toxin activity and pertussis infections. *Infect. Immun.* **46**, 422–428 (1984).
264. Jennewein, M. F. & Alter, G. The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation. *Trends Immunol.* **38**, 358–372 (2017).
265. Batra, J. & Rathore, A. S. Glycosylation of Monoclonal Antibody Products: Current Status and Future Prospects. *Biotechnol. Prog.* (2016). doi:10.1002/btpr.2366
266. Rodríguez, M. E., Hellwig, S. M. M., Pérez Vidakovics, M. L. A., Berbers, G. A. M. & Van De Winkel, J. G. J. *Bordetella pertussis* attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**, 39–47 (2005).

267. van den Berg, B. M., Beekhuizen, H., Willems, R. J., Mooi, F. R. & van Furth, R. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect. Immun.* **67**, 1056–62 (1999).
268. Rodríguez, M. E., Hellwig, S. M. M., Pérez Vidakovics, M. L. A., Berbers, G. A. M. & Van De Winkel, J. G. J. Bordetella pertussis attachment to respiratory epithelial cells can be impaired by fimbriae-specific antibodies. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**, 39–47 (2006).
269. Sato, H. & Sato, Y. Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infect. Immun.* **58**, 3369–3374 (1990).
270. Johansen, F. E. *et al.* Absence of epithelial immunoglobulin a transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. *J. Exp. Med.* **190**, 915–921 (1999).
271. Mosley, Y. Y. C., Lu, F. & HogenEsch, H. Differences in innate IFN $\gamma$  and IL-17 responses to Bordetella pertussis between BALB/c and C57BL/6 mice: role of  $\gamma\delta$ T cells, NK cells, and dendritic cells. *Immunol. Res.* **65**, 1139–1149 (2017).
272. Mosley, Y. Y. C., Radder, J. E. & Esch, H. H. Genetic variation in the magnitude and longevity of the igg subclass response to a diphtheria-tetanus-acellular pertussis (dtap) vaccine in mice. *Vaccines* **7**, 1–14 (2019).
273. Jaffar, Z., Ferrini, M. E., Herritt, L. A. & Roberts, K. Cutting Edge: Lung Mucosal Th17-Mediated Responses Induce Polymeric Ig Receptor Expression by the Airway Epithelium and Elevate Secretory IgA Levels. *J. Immunol.* **182**, 4507–4511 (2009).
274. Althouse, B. M. & Scarpino, S. V. Asymptomatic transmission and the resurgence of Bordetella pertussis. *BMC Med.* **13**, 146 (2015).
275. Fernandez, R. C. Airborne transmission of bordetella pertussis demonstrated in a baboon model of whooping cough. *J. Infect. Dis.* **206**, 808–810 (2012).
276. Feunou, P. F., Kammoun, H., Debrie, A. S., Mielcarek, N. & Locht, C. Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated B. pertussis BPZE1. *Vaccine* **28**, 7047–7053 (2010).
277. Gill, C., Rohani, P. & Thea, D. M. The relationship between mucosal immunity, nasopharyngeal carriage, asymptomatic transmission and the resurgence of Bordetella pertussis. *F1000Research* **25**, 1568 (2017).
278. Boinett, C. J. *et al.* Complete genome sequence of Bordetella pertussis D420. *Genome Announc.* **3**, (2015).
279. Dolby, J. M. & Vincent, W. A. Characterization of the antibodies responsible for the ‘bactericidal activity patterns’ of antisera to Bordetella pertussis. *Immunology* **8**, 499–510 (1965).
280. Muschel, L. H., Gustafson, L. & Larsen, L. J. Re-examination of the Neisser—Wechsberg (antibody prozone) phenomenon. *Immunology* **17**, 525–533 (1969).
281. Shishido, S., Varahan, S., Yuan, K., Li, X. & Fleming, S. Humoral innate immune response and disease. *Clin. Immunol.* **144**, 142–158 (2012).
282. Lopez, A. L., Pineda, E., Garakian, A. & Cherry, J. D. Effect of heat inactivation of serum on Bordetella pertussis antibody determination by enzyme-linked immunosorbent assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 21–24 (1998).
283. Gotto, J. W. *et al.* Biochemical and immunological properties of two forms of pertactin, the

- 69,000-molecular-weight outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **61**, 2211–2215 (1993).
284. Shahin, R. D., Brennan, M. J., Li, Z. M., Meade, B. D. & Manclark, C. R. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* **171**, 63–73 (1990).
285. Jefferson, T., Rudin, M. & DiPietrantonj, C. Systematic review of the effects of pertussis vaccines in children. *Vaccine* **21**, 2003–2014 (2003).
286. Suntarattiwong, P. *et al.* Pertussis surveillance in a children hospital in Bangkok, Thailand. *Int. J. Infect. Dis.* **81**, 43–45 (2019).
287. Blackwood, J. C., Cummings, D. A. T., Broutin, H., Iamsirithaworn, S. & Rohani, P. Deciphering the impacts of vaccination and immunity on pertussis epidemiology in Thailand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9595–9600 (2013).
288. Leuridan, E. Pertussis vaccination in pregnancy: State of the art. *Vaccine* **35**, 4453–4456 (2017).
289. Muangchana, C., Thamapornpilas, P. & Karnkawinpong, O. Immunization policy development in Thailand: The role of the Advisory Committee on Immunization Practice. *Vaccine* **28**, 104–109 (2010).
290. WHO & UNICEF. Global and regional immunization profile - Global. 2019 (2019).
291. Halperin, S. A. *et al.* A Randomized Controlled Trial of the Safety and Immunogenicity of Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Vaccine Immunization during Pregnancy and Subsequent Infant Immune Response. *Clin. Infect. Dis.* **67**, 1063–1071 (2018).
292. Geurtsen, J., Fae, K. C. & van den Dobbelsteen, G. P. Importance of (antibody-dependent) complement-mediated serum killing in protection against *Bordetella pertussis*. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 1229–1240 (2014).
293. Field, L. H. & Parker, C. D. Antibiotic susceptibility testing of *Bordetella pertussis*. *Am. J. Clin. Pathol.* **74**, 312–316 (1980).
294. Guillot, S. *et al.* Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 966–968 (2012).
295. Bartkus, J. M. *et al.* Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: Implications for surveillance of antimicrobial resistance. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1167–1172 (2003).
296. Xu, Z. *et al.* Genomic epidemiology of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in China. *Emerg. Microbes Infect.* **8**, 461–470 (2019).
297. Coutte, L. *et al.* Role of Adhesin Release for Mucosal Colonization by a Bacterial Pathogen. *J. Exp. Med.* **191**, 735–742 (2003).
298. Bals, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* **1**, 141–150 (2000).
299. Plotkin, S. A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 1055–1065 (2010).
300. Blay, K. Le, Caroff, M., Blanchard, F., Perry, M. B. & Chaby, R. Epitopes of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides as potential markers for typing of isolates with monoclonal antibodies. *Microbiology* **142**, 971–978 (1996).

301. Acquaye-Seedah, E., Huang, Y., Sutherland, J. N., DiVenere, A. M. & Maynard, J. A. Humanised monoclonal antibodies neutralise pertussis toxin by receptor blockade and reduced retrograde trafficking. *Cell. Microbiol.* **20**, 1–14 (2018).
302. Lee, S. J., Gray, M. C., Guo, L., Sepo, P. & Hewlett, E. L. Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies against Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin. *Infect. Immun.* **67**, 2090–2095 (1999).
303. Hijnen, M. *et al.* Epitope structure of the Bordetella pertussis protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infect. Immun.* **72**, 3716–3723 (2004).
304. Hijnen, M. *et al.* The role of peptide loops of the Bordetella pertussis protein P.69 pertactin in antibody recognition. *Vaccine* **25**, 5902–5914 (2007).
305. Preston, A. The role of B. pertussis vaccine antigen gene variants in pertussis resurgence and possible consequences for vaccine development. *Hum. Vaccin. Immunother.* (2016).
306. Mosley, Y. Y. C., Radder, J. E., Berndt, A. & HogenEsch, H. Genome-wide association mapping of the antibody response to diphtheria, tetanus and acellular pertussis vaccine in mice. *J. Infect. Dis.* **215**, 466–474 (2017).
307. Weyrich, L. S. *et al.* Resident microbiota affect bordetella pertussis infectious dose and host specificity. *J. Infect. Dis.* **209**, 913–921 (2014).
308. Grönwall, C., Vas, J. & Silverman, G. J. Protective roles of natural IgM antibodies. *Front. Immunol.* **3**, 1–10 (2012).
309. Woof, J. M. & Russell, M. W. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol.* **4**, 590–597 (2011).
310. Caboré, R. N. *et al.* Influence of maternal vaccination against diphtheria, tetanus, and pertussis on the avidity of infant antibody responses to a pertussis containing vaccine in Belgium. *Virulence* **5594**, 1–10 (2017).
311. Abu Raya, B. *et al.* The induction of breast milk pertussis specific antibodies following gestational tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccination. *Vaccine* **32**, 5632–5637 (2014).
312. Vaughan, K., Seymour, E., Peters, B. & Sette, A. Substantial gaps in knowledge of Bordetella pertussis antibody and T cell epitopes relevant for natural immunity and vaccine efficacy. *Hum. Immunol.* **75**, 440–451 (2016).
313. Valentini, D., Ferrara, G., Advani, R., Hallander, H. O. & Maeurer, M. J. Serum reactome induced by Bordetella pertussis infection and Pertussis vaccines: Qualitative differences in serum antibody recognition patterns revealed by peptide microarray analysis. *BMC Immunol.* **16**, 1–12 (2015).

## **Annexe**

## XII. Annexes

### A. Annexe 1

Microbes and Infection 20 (2018) 512–520



Contents lists available at ScienceDirect

Microbes and Infection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micinf](http://www.elsevier.com/locate/micinf)



## Diversion of complement-mediated killing by *Bordetella*

Anaïs Thiriard, Dominique Raze, Camille Locht\*

Université de Lille, CNRS UMR 8204, Inserm U1019, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Centre for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 December 2017  
Received in revised form  
2 February 2018  
Accepted 3 February 2018  
Available online 14 February 2018

#### Keywords:

Complement  
*Bordetella*  
Pertussis  
Antibodies

### ABSTRACT

The complement cascade participates in protection against bacterial infections, and pathogens, including *Bordetella pertussis*, have developed complement-evading strategies. Here we discuss current knowledge on *B. pertussis* complement evasion strategies and the role of antibody-dependent complement-mediated killing in protection against *B. pertussis* infection pointing out important knowledge gaps for further research to improve current pertussis vaccines.

© 2018 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

The complement system was first observed by Buchner in 1891 in the context of Behring's investigations on serum therapy, when it was found to help serum to kill bacteria. In 1895 [1], Jules Bordet supported the "humoral theory" by which immunity depends on the presence of two distinct and dissociable factors involved in the killing of bacteria. The first one is a heat-labile and non-specific factor he called alexin, not required to agglutinate bacteria but able to quickly yet moderately kill pathogens. Alexin is now referred to as complement, according to Ehrlich's designation. The second one is a specific and heat-stable "sensitizing substance" causing bacteria to agglutinate. This substance was earlier identified as antibodies by Ehrlich in 1891. Thus, J. Bordet modified Pfeiffer's theory and elucidated the antibody-dependent complement-mediated killing.

Complement is part of the innate immune response that is mainly activated during pathogen invasion for a robust and fast non-specific pathogen clearance. It also contributes to host homeostasis in healthy conditions and exerts three main functions during a pathologic state, opsonization, direct killing and inflammation via anaphylatoxin release [2]. The complement system also plays a critical role in adaptive immunity by modulating B cell

responses responsible for antibody generation, by inducing and maintaining memory B cells, and by modulating T cell responses, mediating T cell proliferation and survival [3].

### 2. The complement system: pathways and regulation

The complement system is composed of more than 30 proteins. Most of them are synthesized in the liver as an inactive "zymogen" factor that circulates in a soluble form in the blood and to mucosal surfaces [4,5] or is associated with membranes. Besides this classical biosynthesis, specific cell types are able to locally produce complement proteins, such as C1q, C1r and C1s by monocytes, macrophages and dendritic cells, or Factor B and Factor P by polymorphonuclear cells and T lymphocytes [6]. Airway tissues containing endothelial and epithelial cells can also supply complement components via bronchiolar and pulmonary alveolar type II epithelial cells [7,8]. Complement activation leads to a sequential cascade of enzymatic reactions and occurs through three pathways: the classical, the lectin and the alternative pathways (Fig. 1). All pathways end up with the formation of the C5 convertase and the membrane attack complex (MAC), which can result in bacterial lysis.

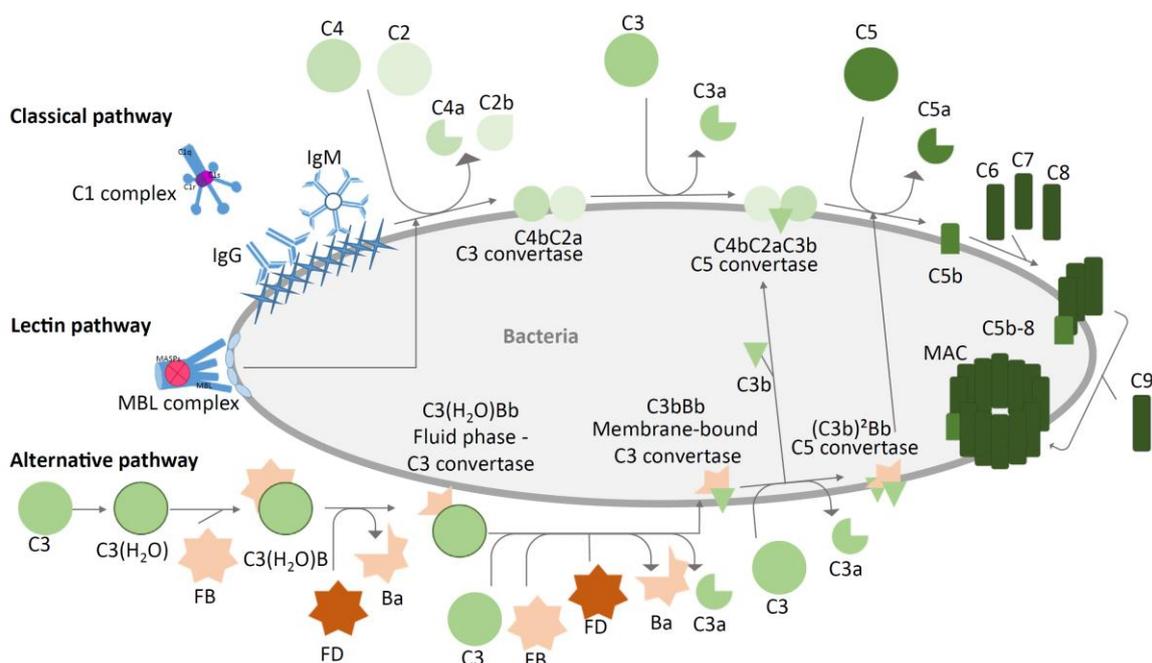
The classical pathway [9] (CP) involves the C1 complex and the antibody-antigen immune complex during infection. The circulating form of C1 is inactive and is composed of 6 molecules of C1q and 2 molecules of each C1r and C1s. C1q recognizes a wide range of mostly charged motifs, including pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as lipopolysaccharides (LPS) and Gram

\* Corresponding author. Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Prof. Calmette, F-59019, Lille Cedex, France. Fax: +33 3 20 87 11 58.

E-mail address: [Camille.locht@pasteur-lille.fr](mailto:Camille.locht@pasteur-lille.fr) (C. Locht).

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.02.002>

1286-4579/© 2018 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.



**Fig. 1.** Complement pathway activation. During infection with a pathogen, the CP and the LP are activated. The inactive C1 complex composed of C1q, C1r and C1s binds to bacterial motifs, such as LPS and porins, and binds also Fc region of bound IgG and IgM on surface antigens. The LP is activated upon fixation of the MBL complex on repeated glycan motifs with MBL, ficolins or collectins. Bound C1- and MBL-complexes activate enzymatic reactions leading to the cleavage of C4 and C2. Released C4b and C2a form the CP and LP C3 convertase, and C4a and C2b are released in the surrounding environment to exert pleiotropic effects. The C3 convertase catalyses C3 decay into C3a anaphylatoxin and C3b that binds to the C3 convertase to form the CP and LP C5 convertase. The AP is constitutively active thanks to autoactivation of C3. Hydrolysis of a C3 thioester function into C3(H<sub>2</sub>O) permits FB binding and triggers cleavage of FB via FD. The fluid phase AP C3 convertase C3(H<sub>2</sub>O)Bb enables the formation of the final membrane-bound AP C3 convertase C3bBb. This final AP C3 convertase cleaves another C3 molecule to release C3b that binds to the convertase to form the AP C5 convertase (C3b)<sup>2</sup>Bb. The released C3b can also be used by the CP and LP to form the C5 convertase C4bC2aC3b. This amplification loop of C3b is essential for complement-mediated killing and opsonisation. All three pathways converge to C5 decay via the C5 convertase complex leading to the terminal complement complex composed of C5b, C6, C7, C8 and polymerised C9 to form the MAC. Once the MAC is established in a bacterial membrane, the forming pore leads to cell death. Abbreviations: CP, classical pathway; LP, lectin pathway; AP, alternative pathway; LPS, lipopolysaccharide; MBL, mannose-binding lectin; MASPs, MBL-associated serine proteases; Ig, immunoglobulin; FD, factor D; FB, factor B; MAC, membrane attack complex.

negative porins, but also host antibodies. C1q binds on the crystallizable fraction (Fc) of IgG and IgM, more efficiently to hexameric than pentameric forms of IgM. Activation of the C1 complex is triggered upon target recognition of the opsonin C1q molecule leading to subsequent internal conformational changes that activate in turn C1r and C1s. Following this activation step, a multi-enzymatic reaction cascade is triggered. Cleavage of C4 and C2 yields the small inactive fragments anaphylatoxin C4a and fluid-phase circulating C2b, as well as the larger active fragments C4b and C2a. C4b binds glycoproteins present on cell surfaces and induces C2a binding to generate the C3 convertase C4bC2a, which cleaves C3 into the C3a anaphylatoxin and the C3b opsonin. Accumulation of C4bC2aC3b forms the C5 convertase complex.

The lectin pathway (LP) [9,10] is similar to the CP. However, its activation relies on the identification of PAMPs or repeated glycan motifs, including mannose structures and N-acetylglucosamine residues found at the surface of numerous pathogens, by either mannose-binding lectins (MBL), or ficolins and collectins that are structurally homologous to MBL. MBL are composed of 6 trimeric subunits associated with 4 related regulatory proteins called MBL-associated serine proteases (MASPs) [11]. The association of MBL and pathogen ligands activates MASPs, thereby inducing enzymatic cleavage of the C4 and C2 proteins as in the CP and continuing the cascade up to the C5 convertase formation.

Whereas the CP and LP must be activated, the alternative pathway (AP) [9] is constitutively active at a basal level, known as “tickover” mechanism. This mechanism involves spontaneous hydrolysis of a thioester bond, which converts C3 into the bioactive form C3(H<sub>2</sub>O), thereby leading to an internal conformational change that exposes a binding site for Factor B (FB). The C3(H<sub>2</sub>O)-FB complex is cleaved by Factor D (FD) to form the AP fluid phase C3 convertase C3(H<sub>2</sub>O)-Bb containing the b moiety from FB. This fluid phase convertase enables C3 decay to release C3a and C3b. The released C3b is stabilised with a FB molecule at the surface of the membrane. Then FB is cleaved by FD in the same way to produce the membrane-bound AP C3 convertase C3bBb. This convertase is stabilised and activated via Factor P (FP or properdin) and interacts with C3 molecules to generate C3a and C3b. Fluid phase C3b accumulation leads to the formation of another complement complex called AP C5 convertase (C3b)<sup>2</sup>Bb and participates in the generation of newly formed membrane-bound AP C3 convertase. This C3b fragment can also be used by the CP and LP, and this amplification loop [12] is essential for a fast C3b opsonization on pathogens surfaces.

Once the C5 convertase complex is assembled, all three complement pathways lead to MAC formation. This complex cleaves C5 into a powerful anaphylatoxin C5a and a C5b fragment. Successive binding of C6 and C7 to C5b stabilizes this complex and allows its integration into the foreign membranes via a lipid-binding site.

Subsequently, C8 recruitment induces binding of C9 components and their polymerization at the surface of membranes, leading to the MAC complex C5b-9 formation. This terminal complement complex drills pores into target membranes, ultimately leading to cell death.

During the enzymatic cascade opsonins IgG, C1q, C3b and C4b deposit on pathogen membranes. This opsonization allows detection and elimination of the tagged cells by phagocytic cells. Through their interaction with G-protein-coupled receptors C3aR and C5aR, the C3a and C5a anaphylatoxins released into the environment exert pleiotropic inflammatory effects [13] and influence adaptive immune responses. They induce smooth muscle contraction, increase blood vessel permeability, enhance immune cell degranulation and intensify chemotaxis for phagocytes recruitment. In addition, a differential influence of C3a and C5a on antibody production, T cell regulation and effector T cell subsets development has also been shown [14]. Excessive release of C3a and C5a is controlled by the inactivating carboxypeptidases to avoid inflammatory damages. Another anaphylatoxin C4a is released during the course of complement activation, but its receptor has not yet been identified and its physiological role is not yet fully understood.

The robust effector functions exerted by the complement system can potentially be deleterious for the host if this system is not well regulated at different key points. This is especially important for the CP, which can be activated in an antibody-independent manner. There is evidence of a cross-talk between the complement and coagulation systems. Thrombin can activate C5 convertase bypassing thereby the first activating steps [15] and blood coagulation factors FXa and FXIa can cleave C5 and C3, leading to C5a and C3a anaphylatoxins release [16]. The AP also needs to be well contained and balanced, as this pathway is constitutively active. Thus the activation of the complement system must be tightly regulated at different stages by surface-bound regulators of complement activation proteins (RCA) [17], and soluble regulators. These exert several functions, including decay-acceleration that increases convertase dissociation and Factor I-mediated cleavage, as well as an early pathway activation control and a late MAC constitution control. To prevent auto-activation of the CP and LP, the C1-Inhibitor protein [18] (C1-INH) interacts irreversibly with the C1 complex and the MBL-MASP complex, leading to their disruption and preventing uncontrolled C3 convertase formation. Moreover, the C4-binding protein (C4bp) binds to CP and LP C4b and accelerates its decay. Its spider-like structure composed of seven  $\alpha$ -chains and one  $\beta$ -chain provides high avidity binding sites for C4b making C4bp a powerful fluid-phase regulators against excessive CP and LP activation. It can be assisted by Factor I for the C4b and C3b cleavage, thereby avoiding non-desired C3 convertase complex formation. Factor I-mediated C3b and C4b cleavage leads to the production of inactive forms (iC3b, C3c, C3dg, C4c and C4d) with opsonin properties that control C3 and C5 convertase formation. Complement receptor 1 (CR1 or CD35), membrane cofactor protein (MCP or CD46), decay accelerating factor (DAF or CD55), C4bp and Factor H (FH) are all co-factors in Factor I-mediated cleavage of C3b and C4b. CR1, MCP and DAF belong to the RCA family. CR1 and DAF facilitate the decay of C3 and C5 convertases thus inhibiting their formation. Factor H competes with Factor B for C3b fixation and accelerates the dissociation of the AP C3 convertase by removing the Bb moiety. The MAC formation and C9 polymerization can be limited by vitronectin (S protein), protectin (CD59) and clusterin (SP-40).

### 3. Pathogen-mediated subversion of the complement system

As complement-mediated bacterial killing is one of the first counteracting host defence mechanisms triggered upon pathogenic

infection, several mechanisms for immune evasion have thus evolved for many bacterial pathogens to bypass the complement system. This includes the recruitment of RCA and the inhibition or inactivation of complement proteins. As such, *Staphylococcus aureus* [19,20] has become a master in the art of hiding and diversion. This bacterium expresses a wide range of proteins able to stop activation of complement at different early key points. Staphylococcal superantigen-like proteins, SSL7 and SSL10, bind respectively to IgA and IgG, and staphylococcal protein A (SpA) and immunoglobulin-binding protein A (Sbi) are both able to bind to the Fc portion of immunoglobulins, thereby avoiding CP activation. CP activation is blocked by Sbi-I and Sbi-II by interfering with C1q binding and Sbi-III and Sbi-IV interfere with C3 and FH to block AP. Furthermore, *S. aureus* produces staphylokinase and a receptor for plasminogen, resulting in the conversion of plasminogen into plasmin and consequently the degradation of coated opsonins (IgG, C3b) with surface-bound plasmin. Moreover, the members of the staphylococcal complement inhibitor (SCIN) protein family inhibit C3 convertase activity. *S. aureus* can also bind C5 via SSL7 to inhibit C5a and C5b production, thereby decreasing MAC formation.

Streptococci [21,22] have also developed many bypassing strategies to subvert complement-mediated lysis. Among other functions, these bacteria are able to impair the initial deposition of immunoglobulins and opsonins (IgM, IgG, iC3b, C3b) thanks to their polysaccharide capsule. A wide range of streptococcal proteins binds to RCA, the pneumococcal surface protein A PspA recruits FB, PspC and the murein hydrolase LytA bind to FH and C4bp, and the elongating factor Tuf catches FH and the Factor H-like protein 1 (FHL-1). In addition, they can bind to complement components impairing their activity. PspA inhibits the formation of C3 convertase in all 3 pathways and promotes its dissociation. Tuf, PspC and LytA hinder AP C3 convertase formation, and PspC and, in particular, LytA hamper CP/LP C3 convertase assembly. *Pseudomonas* [19,23] sp. produces several proteases, such as the elastase PaE and the alkaline protease PaAp which are known to degrade immunoglobulins and C1q and to cleave C3.

Certain viruses, such as smallpox and cowpox viruses impede C3 convertase formation and produce complement-inhibiting proteins [24]. Herpes viruses express transmembrane glycoproteins gC which bind to C3b and accelerate AP C3 convertase decay [25].

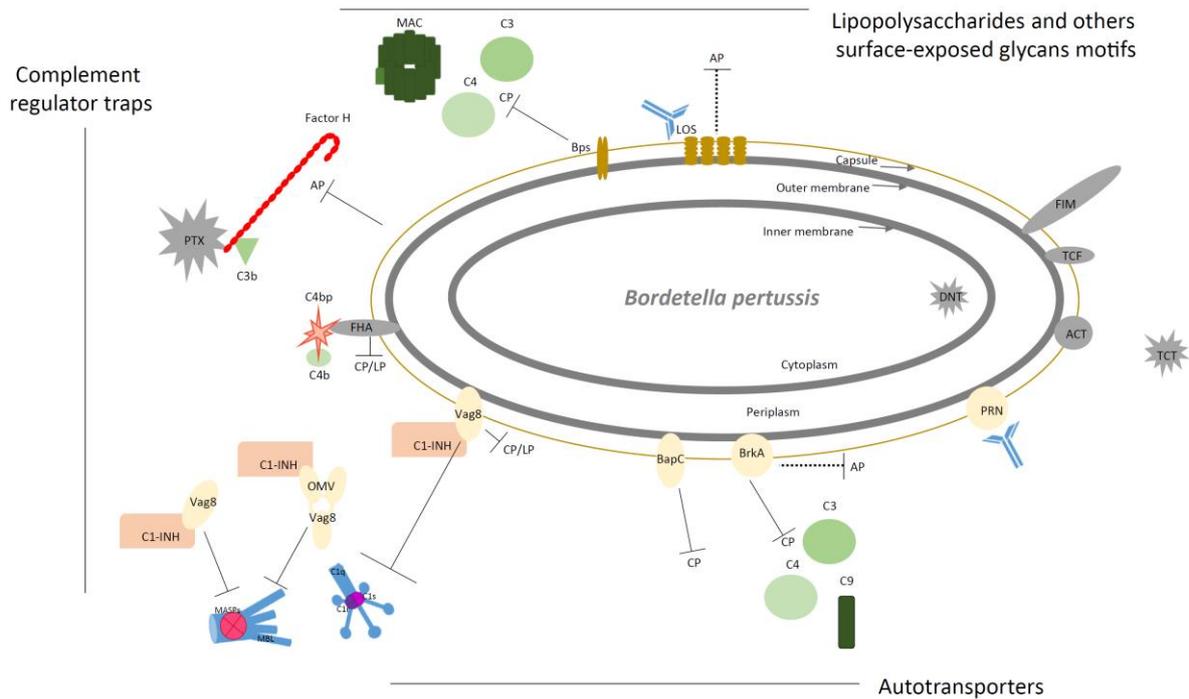
Parasites, including *Schistosoma* [26] and *Trypanosoma* [27], present C2 receptor inhibitor trispanning (CRIT) [28] which catches C2 to inhibit C3 convertase formation. Moreover, *Schistosoma* proteases degrade the iC3b fragment, which serves as opsonin, and thus down-regulate associated phagocytosis. Schistosomes also produce paramyosin proteins preventing C1 complex binding and MAC formation.

### 4. *Bordetella pertussis* complement evasion strategies

*B. pertussis*, the causative agent of whooping cough, a severe and life-threatening respiratory disease, has also elaborated several mechanisms for complement-mediated immune evasion (Fig. 2). *Bordetella* lipooligosaccharides (LOS), other surface-exposed glycan motifs and several surface-exposed proteins have been shown to exert complement evasion activities [29].

#### 4.1. Lipopolysaccharides and other surface-exposed glycan motifs

For most Gram-negative pathogens, lipopolysaccharide (LPS) is classically associated with complement resistance, as thick O-antigen structures prevent complement protein deposition onto the bacteria surface. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* strains display typical LPS at their surfaces [30], whereas *Bordetella pertussis* strains produce a modified form of LPS, referred



**Fig. 2.** *B. pertussis* complement evasion strategies. *B. pertussis* has raised various mechanisms, including specific membrane motifs, autotransporters and complement traps to impede complement killing. LOS has been shown to reduce to a certain extent sensitivity toward naïve serum but is not sufficient to protect against immune serum. Bps prevents C3, C4 and MAC deposition on the surface. The amount of C3b opsonin is controlled by FH, and PTX is able to bind to a super-evasion site on FH enhancing AP regulatory functions of FH, including C3b decay. FHA binds C4bp that regulates C4b to increase C4b decay, thus preventing C3 and C5 convertase formation. BrkA exerts resistance toward AP and CP by decreasing C3, C4 and C9 deposition on the bacterial surface. BapC confers resistance to CP-mediated killing by human serum. Vag8 is able to bind C1-INH to subvert its initial function of controlling excessive CP and LP C3 convertase formation. Vag8-bound C1-INH interferes with C1-INH function, including C1r, C1s and MASP-2 binding, at the bacterial surface, on its secreted passenger domain and on Vag8-composed OMV, leading to proteases release and subsequent C2 and C4 consumption. Abbreviations: LOS, lipooligosaccharides; Bps, *Bordetella* polysaccharides; PTX, pertussis toxin; FH, factor H; FHA, filamentous haemagglutinin; BrkA, *Bordetella* resistance to killing A protein; BapC, *B. pertussis* autotransporter protein C; PRN, pertactin; ACT, adenylate cyclase toxin; TCF, tracheal colonization factor; FIM, fimbriae; DNT, dermonecrotic toxin; OMV, outer membrane vesicle; CP, classical pathway; LP, lectin pathway; AP, alternative pathway; MBL, mannose-binding lectin; MASP, MBL-associated serine protease; Ig, immunoglobulin; MAC, membrane attack complex; Vag8, virulence-associated gene 8.

to as LOS [31], as it lacks the repeat O-side chains but contains the distal terminal trisaccharide. The exact role of LPS and LOS in *Bordetella* immunogenicity and pathogenesis is not yet fully understood, but it appears to be responsible for the reactogenicity of the whole-cell pertussis vaccines. Its synthesis depends on numerous genes, including the *wbm* and *wlb* operons, previously named *bpl*. The *Bordetella wlb* operon is in charge of distal trisaccharide production, and its deletion results in O-antigen deficiency. The expression of the *wlb* operon is required for *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis* resistance to naïve serum, but is not sufficient to overcome antibody-dependent complement-mediated killing [32]. Similarly, the *wbm* operon, responsible for production of the long-chain O-antigen, mediates resistance to antibody-independent complement-mediated killing of *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*. Moreover, in the presence of antibodies, the loss of O-antigen in *B. bronchiseptica* increases antibody-dependent complement-mediated lysis, while the *B. parapertussis* O-antigen which is able to prevent C3 deposition on the surface and hampers complement-mediated killing, is not sufficient to prevent CP-mediated lysis [32]. The CP seems to be the only efficient pathway for *Bordetella* killing, as C2- and antibody-depleted serum do not trigger bacterial lysis [33]. Moreover, except *Bordetella avium* and *B. pertussis*, all other *Bordetella* species appear to be resistant to the AP [34]. For *B. pertussis*, there are conflicting reports about its

serum-resistance capacity in the AP. Most studies show a certain level of resistance to naïve serum [34,35], while others highlight *B. pertussis* sensitivity to naïve serum [32,36]. However, all agree on its sensitivity towards immune serum. The different experimental procedures used to assess serum sensitivity, including different strains, the origin and amount of complement and serum, and exposure time used in the various studies may explain the divergent findings. O-antigen-mediated serum resistance correlates with the presence of the high molecular weight O-side chains in *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis* compared to *B. pertussis* which appears to be more susceptible to serum-mediated killing than the former two species [37]. The high molecular weight O-side chains sterically hinder MAC deposition in Gram-negative bacteria, such as *Klebsiella pneumoniae* [38], and thus prevent complement-mediated killing. Interestingly, an O-side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* strain exhibits complement resistance, owing to the production of a capsule [39]. Of note, a microcapsule on *B. pertussis* laboratory strains and clinical isolates has recently been shown. This microcapsule is synthesized during the virulent phase, but up-regulated in the avirulent phase. However, the presence of this microcapsule does not seem to enhance the resistance of *B. pertussis* to complement-mediated killing [40].

*B. pertussis*, like *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*, expresses a polysaccharide, known as Bps, which is similar to the poly-β-

(1,6)-linked polymeric-N-acetylglucosamine polysaccharides. Bps is essential for early colonization in the nose and trachea of mice, as it promotes nasal epithelial cell attachment and is required for stability and maintenance of biofilms [41]. The biofilm formation in the nasopharynx enables host immune defence escape. Bps polysaccharides lead to complement-mediated killing evasion as Bps-deficient mutants display an increase in sensitivity to human serum-mediated killing compared to wild type bacteria [42]. This evasion strategy is strictly limited to the CP and occurs at different steps during the enzymatic cascade. Increased amounts of C3, C4 and MAC deposition on the surface of Bps-deficient mutants compared to wild type strains confirm the essential role of Bps in complement evasion. Finally, mouse experiments illustrated a role for Bps in bacterial lung colonization, even though lung epithelial cell attachment through Bps upon *Bordetella* infection has not yet been clearly shown.

#### 4.2. Complement regulators traps

Even though the CP seems to be the main pathway involved in *B. pertussis* killing, this pathogen also employs strategies to overcome the AP. The AP is mainly regulated by FH, factor H-like (FHL) and FH-related proteins (FHR) by binding C3b to promote Factor I-mediated cleavage, competing with Factor B for C3b association, and accelerating the AP C3 convertase (C3Bb) decay. Different *Bordetella* species, including *B. pertussis* and *B. parapertussis*, as well as a wide range of other pathogens such as *Neisseria* and *Streptococcus* species, bind to FH, FHR-1 and FHL-1. Interestingly, *Bordetella holmesii*, but not *B. avium*, binds weakly to FH whereas *B. pertussis* Tohama I and clinical isolates, as well as *B. parapertussis*, strongly bind to FH. Since *B. pertussis* and *B. parapertussis* bind to FH, FHR-1 and FHL-1, different binding sites are likely to be involved [34]. A common microbial binding site located in domain 20 of FH (FH20), corresponding to the C-terminal region of FH, is known to be bound by several microbial surface structures. FH binds to C3b in domain 1 to 4 and 19 to 20 and therefore contributes to the constitution of a tripartite complex composed of the microbial structures-C3b-FH [43]. Binding to this “superevasion site” enhances regulatory functions of FH, in particular Factor I-mediated cleavage of C3b, thereby providing resistance to AP. Thus, surface-bound FH inhibits AP-mediated killing and contributes to bacterial survival in serum [34], a potential reason why many pathogens have evolved to escape AP via this common microbial binding site [44]. Different bacterial FH-binding factors have been identified, such as FH-binding protein A (FhbA) from *Borrelia hensii*, translation elongation factor Tu (Tuf) from *Pseudomonas aeruginosa* and a LOS sialylation motif mimicking the host cell membrane from *Neisseria gonorrhoeae* [45]. However, the *B. pertussis* FH-binding factor has not yet been identified, but enhanced serum-mediated killing was shown for strains lacking pertussis toxin (PTX), suggesting its potential role in FH binding. Notwithstanding, other studies have shown FH binding by PTX-deficient strains, implying that other factors are likely involved [34].

As many other pathogens, such as *Streptococcus pyogenes* and *Neisseria meningitidis*, *B. pertussis* is also able to bind to C4bp. *B. pertussis* like *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* and *B. holmesii*, but not *B. avium* or *Bordetella hinzii* bind to C4bp via filamentous haemagglutinin (FHA) [46] a virulence factor controlled by BvgAS, a two-component system which is known to control the biosynthesis of most virulence factors of *B. pertussis* [47]. The C4bp complement regulatory function is maintained upon FHA binding. The FHA-binding site located on C4bp  $\alpha$ -chains is very similar to the C4b-binding site and relies on ionic interactions [48]. Interestingly, the FHA-binding site is also employed to bind heparin. This binding

could be mediated via the N-terminal heparin-binding domain of FHA, but further studies are needed to understand the underlying mechanisms. Interestingly, FHA-deficient mutants are still able to bind C4bp, albeit at a lower level. However, C4bp binding is completely abolished in *bvg* mutants, suggesting the involvement of other Bvg-regulated virulence factors [46]. The protective role of anti-FHA antibodies in complement-mediated killing is not well established since mutants deficient in FHA production have an equivalent serum sensitivity compared to wild type strains [49].

#### 4.3. Autotransporters

*Bordetellae* species produce several autotransporter proteins that are associated with various cellular functions, including bacterial adhesion and biofilm formation. Some of them have evolved to confer serum resistance. Autotransporter proteins are characterized by N-terminal passenger domains and C-terminal  $\beta$ -barrel outer-membrane domains responsible for the secretion and surface display of the passenger domains [50]. For several autotransporters the passenger domain can be cleaved off from the C-terminal  $\beta$ -barrel and be excreted into the extracellular milieu. A Bvg-regulated autotransporter, identified as the *Bordetella* resistance to killing A protein, BrkA, has been reported to be involved in complement evasion in *B. pertussis*. This virulence factor is present in *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis* but not in *B. avium*. In *B. pertussis*, BrkA promotes resistance towards the antibody-dependent CP [35] but it also elicits serum resistance in the absence of antibodies to a certain extent [51]. Clinical isolates of *B. pertussis* and *B. parapertussis* may produce various levels of BrkA, which apparently influences the serum sensitivity of these strains [51,52]. Curiously, a serum-sensitive *B. bronchiseptica* strain lacking the BrkA protein did not recover its resistance towards serum after complementation. Furthermore, loss of BrkA expression in another *B. bronchiseptica* strain had no impact on serum resistance. It was therefore concluded that BrkA does not mediate serum resistance in *B. bronchiseptica* but that, in this species, LPS may be the major factor that mediates serum resistance [53]. In *B. pertussis*, the *brk* locus may also provide a serum-resistance mechanism that involves the recruitment of complement proteins [49]. A BrkA-deficient mutant was shown to be highly sensitive to serum-mediated killing compared to the wild-type parental strain, while a strain containing two copies of *brkA* was found to be more resistant than the wild type. Resistance is thus proportional to the level of BrkA production and correlated with the decrease in C4, C3 and C9 deposition on the bacterial surface, the degradation of the C4 component and the decrease in C5b-9 production [54]. In contrast, *brkA* expression does not impact C1 deposition on the bacterial surface. This complement component diversion is also exerted by the polysaccharides [42].

Recent studies identified an additional autotransporter protein, called *B. pertussis* autotransporter protein C (BapC or Bap-5), the gene of which is also present in the *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis* genomes. BapC production is also regulated by the two-component BvgAS system [55]. It is mainly exposed at the surface of the bacteria [56] and plays a role in virulence for lung colonization and persistence [57]. In *B. pertussis* BapC confers resistance to killing by human serum [57], in particular by the CP [56]. BapC-deficient mutants are more sensitive to complement-mediated killing than BapC-producing strains. Interestingly, double, BapC- and BrkA-deficient mutants display higher sensitivity to serum-mediated killing compared to respective single mutants, but still lower sensitivity compared to *bvg*<sup>-</sup> strains [57]. These observations show the additional effect of two different autotransporters on complement resistance and suggest the involvement of further *bvg*-regulated proteins in serum resistance.

*B. pertussis* also expresses the Virulence-associated gene 8 (Vag8) autotransporter protein regulated by the BvgAS system. The C-terminal domain of Vag8 has been shown to share strong sequence similarities with other *Bordetella* autotransporter proteins, including the tracheal colonization factor (Tcf), BrkA and pertactin (PRN) [58]. Vag8 plays a critical role in the subversion of the regulatory protein C1 esterase inhibitor (C1-INH) and therefore mediates resistance to the CP and the LP. By binding to C1-INH, Vag8 sequesters this protein at the bacterial surface [59]. In addition, it also transports C1-INH away from the bacteria via its secreted passenger domain and on full-length Vag8 present in outer membrane vesicles [60,61]. The binding of Vag8 to C1-INH results in the presence of active C1r, C1s, MASP-1 and MASP-2 in the surrounding environment of the bacteria, leading to C4 and C2 cleavage and consumption away from the bacteria surface. Consequently, the lack of free C4 and C2 decreases their deposition on the surface of the bacteria upon activation of the CP or LP and thus confers resistance to killing by normal human serum in a dose-dependent manner. An effect of Vag8 on C3b and C4b consumption has also been shown, as well as on C5b-9 deposition on bacterial membranes [61] in a dose-dependent manner. Fixation of Vag8 on C1-INH requires the active serpin domain of the Vag8 passenger domain. Serum resistance activity is expressed during the virulent phase of *B. pertussis* in a Bvg-dependent manner [59,62]. Even though *vag8* homologues are present in the *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis* chromosomes [58], the acquisition of C1-INH via Vag8 has so far only been observed in *B. pertussis* [62]. Interestingly, compared to older isolates, Vag8 production is increased in the recent *B. pertussis* *ptxP3* strains [63], potentially rendering this lineage more resistant to complement-mediated killing than the older strains. Up to now, *Bordetella* is the only bacterial genus known to be capable of binding complement regulatory proteins and interfering with protease deposition away from the bacterial surface.

### 5. The role of antibody-dependent complement-mediated killing in protection against pertussis

It was by studying the specific serum properties that J. Bordet and O. Gengou unequivocally identified the whooping cough agent [64,65]. They found that complement, when mixed with heat-inactivated serum from convalescent whooping cough patients, but not from other patients, was able to bind to bacilli isolated very early after the onset of pertussis disease, but not to other bacteria. By binding to the specific bacilli, the complement was no longer available to lyse red blood cells in an *in-vitro* assay, called complement-deviation assay. A complement-independent property of pertussis-specific antiserum was its ability to specifically agglutinate the whooping cough agent. These two properties were the first hints towards understanding protective immune mechanisms against pertussis.

Later studies aimed at evaluating serological markers of protection, but initial observations remained controversial. In the first part of the 20th century, passive and active protection experiments against intraperitoneal and intracerebral challenge in mice supported the protective role of agglutinating antibodies, while others showed the importance of complement-binding antibodies. Differences were observed according to the route of administration and the route of challenge [66]. Therefore, protection might rely on distinct mechanisms [67,68] and distinct antibody properties [69]. In the mid-20th century, the first serum bactericidal test [69,70] against *B. pertussis* organisms allowed to assess the bactericidal activity of antibodies *in vitro* [71] in an attempt to unite *in vivo* protection and *in vitro* activity. Indeed,

active or passive immunization experiments showed good correlations between complement-mediated bactericidal serum antibody titres and protection in mice and children [72]. It was then suggested that the nature of antibodies and the nature of antigens are responsible for this bactericidal activity [73]. At that time, little was known about the chemical nature of *B. pertussis* protective antigens. Studies on *N. gonorrhoeae* [74] produced evidence that the bactericidal antigen of Gram negative organisms may be LPS, which was indeed shown to also be the case for *B. pertussis* [75].

*B. pertussis* exhibits various surface components that may interact directly with host defences to control pathogen infection and dissemination. LPS and LOS are the major constituents of the cell wall of Gram negative bacteria and are determinants of virulence and immunity. *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* express two LOS phenotypes, characterized by band A and band B upon denaturing gel electrophoresis, whereas *B. parapertussis* produces only the band B form. *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* LOS band A can be bound by the agglutinating IgG3 monoclonal antibodies (mAb) G10F8C3 and E8D8B1 [76]. However, these antibodies appear to only agglutinate *B. pertussis*. Interestingly, G10F8C3 was shown to express complement-dependent bactericidal activity *in vitro* and to reduce colonization in the trachea and lungs of aerosol infected mice [77]. Moreover, various bactericidal IgG1 (BL-1), IgG3 (BL-2, BL-4, BL-5) and IgM (BL-3) mAb also bind *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* band A, but display their bacteriolytic effect only on *B. pertussis*. Interestingly, these bactericidal antibodies are associated to a unique epitope on LOS band A, that is different from that of the non-bactericidal IgG1 mAb BL-6 and BL7 [78]. In addition, BL-1 and BL-2, IgG1 and IgG3, respectively, express both *in vitro* bactericidal properties and *in vivo* protection following aerosol challenge, suggesting a correlate between bactericidal activity and protection *in vivo*. On the other hand, although BL-6 and BL-7, both IgG1, were not bactericidal *in vitro* but appeared to protect mice by up to 66% and 87% after aerosol infection. Conversely, the IgG3 BL-5 did not protect mice against aerosol challenge *in vivo*, while displaying *in vitro* killing [79]. Thus, there is no strict correlation between *in vitro* bactericidal activity and *in vivo* protection. Importantly, all the protective mAb (BL-1, BL-2, BL-6, BL-7) share common idiotopes that are different from those of the non-protective mAb (BL-5), suggesting a possible involvement of specific epitopes in antibody-mediated protection. The oligosaccharide moiety of the *B. pertussis* LOS induces IgG3 and IgM production and triggers bactericidal activity, suggesting the fundamental role of glycan structures to confer complement-mediated killing [80,81]. Thus, LOS is engaged in double dealing, as its O-antigen can induce bactericidal antibodies, whilst high molecular weight O-side chains also confer protection against complement-mediated killing by serum [36,37,82]. The various mAb to LOS provided an efficient tool to characterize antigenic epitopes of *B. pertussis* LOS and revealed at least 3 immunodominant regions: the proximal oligosaccharide part that is attached to the hydrophobic lipid A region, the terminal region of the distal trisaccharide and the intermediate region with particular glycan motifs [83,84].

In addition to LOS, further investigations illustrated the role of other antigens that generate bactericidal antibodies in human serum, such as *bvg*-regulated virulence factors. The autotransporter protein pertactin was shown to induce bactericidal antibodies that correlate with reduced bacterial loads in the respiratory tract upon *B. pertussis* infection in mice [85]. Pertactin is one of the antigens present in most acellular pertussis vaccines and appears to enhance protection of these vaccines compared to acellular vaccines not containing pertactin [86].

Since the serum resistance protein BrkA can overcome bactericidal activities of serum induced by *B. pertussis* antigens, such as LOS and pertactin, neutralizing the BrkA activity by anti-BrkA antibodies may enhance the protective effects of pertussis vaccines [87]. The addition of BrkA to two-component acellular pertussis vaccines, composed of PTX and FHA, indeed enhanced protection *in vivo* in mice [88], although addition of BrkA to three-component acellular vaccines (PTX, FHA, pertactin) did not improve the protective effect.

Several studies have aimed at determining the relationship of effector functions of antibodies and vaccine-induced protection, but conflicting conclusions reported did not permit to find a correlate of protection [89–92]. The divergent observations may be explained by the different methods applied and the different acellular vaccines tested (e.g. two-component versus three-component vaccines). Some evaluated antibody titers determined by ELISA and others assessed bactericidal activity, with various sources and concentrations of complement [93].

Although acellular vaccines protect well against severe pertussis disease, they do not prevent *B. pertussis* infection and transmission, as shown in a non-human primate model [94]. Sera collected from convalescent or exposed individuals activate complement-mediated killing, whereas sera from subjects vaccinated with two-component (FHA, PTX) acellular pertussis vaccines do not. However, unlike two-component acellular pertussis vaccines, individuals immunized with three-component acellular vaccines, containing pertactin in addition to PTX and FHA, are able to generate bactericidal anti-serum [93]. The addition of serotype 2 and serotype 3 fimbriae to three-component acellular vaccines does not appear to enhance bactericidal activity of the immune serum. It is possible that antibodies that are not able to bind complement compete with complement-binding antibodies and thereby prevent their fixation to the antigens on the bacterial surface [93,95].

## 6. Conclusion

In this review, we briefly outlined the mechanisms exerted by *B. pertussis*, the etiological agent responsible for whooping cough, to divert complement-mediated killing. The complement system is one of the first-line host defences to non-specifically counteract pathogen invasion. *B. pertussis* has evolved by developing various ways to subvert key steps in complement activation. It is thus conceivable that complement-mediated killing of *B. pertussis*, especially when triggered by specific antibodies, may play an important role in protection against this organism. However, current knowledge has not yet provided conclusive evidence of a strong protective correlate between antibody-dependent complement-mediated killing and protection against *B. pertussis* infection. Studying the role of complement and particularly of antibody-dependent complement-mediated killing of *B. pertussis* may be essential to understand vaccine-induced protection and should be helpful to improve current vaccines. Although the currently available vaccines provide high levels of protection, especially against severe pertussis disease, recent years have witnessed important limitations of these vaccines. They include fast waning of protective immunity induced especially by acellular vaccines, their inability to control *B. pertussis* infection and transmission, and the emergence of *B. pertussis* strains lacking vaccine antigens. Therefore, new vaccines are urgently needed [96]. A better understanding of the immune responses induced by infection or vaccination, including the role of complement evasion and antibody-dependent complement-mediated killing in protection against *B. pertussis* infection and transmission would be expected to be useful for the design of improved vaccines.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

A.T. holds a fellowship of the Région Haut-de-France and Inserm.

## References

- [1] Bordet J. Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés. *Ann Inst Pasteur* 1895;6:462–506.
- [2] Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol* 2015;6:1–26.
- [3] Killick J, Morisse G, Sieger D, Astier AL. Complement as a regulator of adaptive immunity. *Semin Immunopathol* 2018;40:37–48.
- [4] Greiff L, Andersson M, Erjefält JS, Persson CG, Wollmer P. Airway microvascular extravasation and luminal entry of plasma. *Clin Physiol Funct Imag* 2003;23:301–6.
- [5] Persson CG, Erjefält JS, Greiff L, Andersson M, Erjefält I, Godfrey RWA, et al. Plasma-derived proteins in airway defence, disease and repair of epithelial injury. *Eur Respir J* 1998;11:958–70.
- [6] Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C, Trouw LA. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol* 2017;188:183–94.
- [7] Strunk RC, Eidlén DM, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest* 1988;81:1419–26.
- [8] Varsano S, Kaminsky M, Kaiser M, Rashkovsky L. Generation of complement C3 and expression of cell membrane complement inhibitory proteins by human bronchial epithelium cell line. *Thorax* 2000;55:364–9.
- [9] Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol* 2015;6:1–30.
- [10] Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, et al. A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. *Immunol Rev* 2016;274:74–97.
- [11] Wallis R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology* 2007;212:289–99.
- [12] Lachmann PJ. The amplification loop of the complement pathways. *Adv Immunol* 2009;104:115–49.
- [13] Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Köhl J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 2009;46:2753–66.
- [14] Zhou W. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology* 2012;217:225–34.
- [15] Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 2006;12:682–7.
- [16] Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol* 2008;632:71–9.
- [17] Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009;9:729–40.
- [18] Davis AE, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemostasis* 2010;104:886–93.
- [19] Lambiris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:132–42.
- [20] Thamavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:529–43.
- [21] Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LFC, Ribeiro ML, Leite LCC, et al. Role of *Streptococcus pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. *Front Microbiol* 2017;8:1–20.
- [22] Józsi M. Factor H family proteins in complement evasion of microorganisms. *Front Immunol* 2017;8:1–8.
- [23] Rooijackers SHM, van Strijp JAG. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* 2007;44:23–32.
- [24] Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* 2000;861–926.
- [25] Lubinski JM, Wang L, Soulika AM, Burger R, Wetsel RA, Colten H, et al. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion *in vivo*. *J Virol* 1998;72:8257–63.
- [26] Schroeder H, Skelly PJ, Zipfel PF, Losson B, Vanderplasschen A. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Dev Comp Immunol* 2009;33:5–13.
- [27] Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, de Messias-Reason JJ. The complement system: a prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol* 2017;8:1–14.
- [28] Inal JM, Hui K, Miot S, Lange S, Ramirez MI, Schneider B, et al. Complement C2 receptor inhibitor trispanning: a novel human complement inhibitory receptor. *J Immunol* 2017;174:356–66.

- [29] Jongerius I, Schuijt TJ, Mooi FR, Pinelli E. Complement evasion by *Bordetella pertussis*: implications for improving current vaccines. *J Mol Med* 2015;93:395–402.
- [30] Preston A, Petersen BO, Duus J, Kubler-Kielb J, Ben-Menachem G, Li J, et al. Complete structures of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2006;281:18135–44.
- [31] Caroff M, Brisson JR, Martin A, Karibian D. Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett* 2000;477:8–14.
- [32] Harvill ET, Preston A, Cotter PA, Allen AG, Maskell DJ, Miller JF. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun* 2000;68:6720–8.
- [33] Barnes MG, Weiss AA. Activation of the complement cascade by *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;220:271–5.
- [34] Amdahl H, Jarva H, Haanperä M, Mertsola J, He Q, Jokiranta TS, et al. Interactions between *Bordetella pertussis* and the complement inhibitor factor H. *Mol Immunol* 2011;48:697–705.
- [35] Fernandez RC, Weiss AA. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* 1994;62:4727–38.
- [36] Burns VC, Pishko EJ, Preston A, Maskell DJ, Harvill ET. Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun* 2003;48:833–6.
- [37] Byrd DW, Roop RM, Veit HP, Schurig GG. Serum sensitivity and lipopolysaccharide characteristics in *Bordetella bronchiseptica*, *B. pertussis* and *B. parapertussis*. *J Med Microbiol* 1991;34:159–65.
- [38] Merino S, Campforné S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun* 1992;60:2529–35.
- [39] Alvarez D, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ, Alberti S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect Immun* 2000;68:953–5.
- [40] Neo YL, Li R, Howe J, Hoo R, Pant A, Ho SY, et al. Evidence for an intact polysaccharide capsule in *Bordetella pertussis*. *Microb Infect* 2010;12:238–45.
- [41] Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 2010;77:1439–55.
- [42] Ganguly T, Johnson JB, Kock ND, Parks GD, Deora R. The *Bordetella pertussis* Bps polysaccharide enhances lung colonization by conferring protection from complement-mediated killing. *Cell Microbiol* 2014;16:1105–18.
- [43] Meri T, Amdahl H, Lehtinen MJ, Hyvärinen S, McDowell JV, Bhattacharjee A, et al. Microbes bind complement inhibitor factor H via a common site. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003308.
- [44] Parente R, Clark SJ, Inforzato A, Day AJ. Complement factor H in host defense and immune evasion. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:1605–24.
- [45] Ngampasutadol J, Ram S, Gulati S, Agarwal S, Li C, Visintin A, et al. Human factor H interacts selectively with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific complement evasion. *J Immunol* 2008;180:3426–35.
- [46] Berggård K, Johnsson E, Mooi FR, Lindahl G. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 1997;65:3638–43.
- [47] Smith A, Guzman C, Walker M. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* 2001;25:309–33.
- [48] Berggård K, Lindahl G, Dahlbäck B, Blom AM. *Bordetella pertussis* binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b. *Eur J Immunol* 2001;31:2771–80.
- [49] Fernandez RC, Weiss AA. Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett* 1998;163:57–63.
- [50] Wells TJ, Tree JJ, Ulett GC, Schembri MA. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol Lett* 2007;274:163–72.
- [51] Elder KD, Harvill ET. Strain-dependent role of BrkA during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract. *Infect Immun* 2004;72:5919–24.
- [52] Stefanelli P, Sanguinetti M, Fazio C, Posteraro B, Fadda G, Mastrantonio P. Differential in vitro expression of the brkA gene in *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2006;44:3397–400.
- [53] Rambow AA, Fernandez RC, Weiss AA. Characterization of BrkA expression in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 1998;66:3978–80.
- [54] Barnes MG, Weiss AA. BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun* 2001;69:3067–72.
- [55] Bokhari H, Bilal I, Zafar S. BapC autotransporter protein of *Bordetella pertussis* is an adhesion factor. *J Basic Microbiol* 2012;52:390–6.
- [56] Riaz MR, Siddiqi AR, Bokhari H. Structural and functional studies of BapC protein of *Bordetella pertussis*. *Microbiol Res* 2015;174:56–61.
- [57] Noofeli M, Bokhari H, Blackburn P, Roberts M, Coote JG, Parton R. BapC autotransporter protein is a virulence determinant of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 2011;51:169–77.
- [58] Finn TM, Amsbaugh DF, Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun* 1998;66:3985–9.
- [59] Marr N, Shah NR, Lee R, Kim EJ, Fernandez RC. *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One* 2011;6:e20585.
- [60] Raeven RHM, Van Der Maas L, Tilstra W, Uittenbogaard JP, Bindels THE, Kuipers B, et al. Immunoproteomic profiling of *Bordetella pertussis* outer membrane vesicle vaccine reveals broad and balanced humoral immunogenicity. *J Proteome Res* 2015;14:2929–42.
- [61] Hovingh ES, van den Broek B, Kuipers B, Pinelli E, Suzan H, Rooijackers M, et al. Acquisition of C1 inhibitor by *Bordetella pertussis* virulence associated gene 8 results in C2 and C4 consumption away from the bacterial surface. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006531.
- [62] Marr N, Luu RA, Fernandez RC. *Bordetella pertussis* binds human C1 esterase inhibitor during the virulent phase, to evade complement-mediated killing. *J Infect Dis* 2007;195:585–8.
- [63] De Gouw D, Hermans PWM, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, et al. Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One* 2014;9:e84523.
- [64] Bordet J. Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytotyriques. *Ann Inst Pasteur* 1900;5:257–96.
- [65] Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur* 1906;9:731–41.
- [66] Dolby JM, Standfast AFB. A comparison of passive protection tests against intranasal and intracerebral challenges with *Bordetella pertussis*. *Immunology* 1958;1:144–56.
- [67] Dolby JM, Thow D, Standfast AFB. The intranasal infection of mice with *Bordetella pertussis*. *J Hyg* 1961;59:205–16.
- [68] Dolby JM, Standfast AFB. The intracerebral infection of mice with *Bordetella pertussis*. *J Hyg* 1961;59:205–16.
- [69] Dolby JM. The antibacterial effect of *Bordetella pertussis* antiserum. *Immunology* 1965;8:484–98.
- [70] Brighton WD, Lampard J, Sheffield F, Perkins FT. Variation of killing power of human sera against *Bordetella pertussis*. *Clin Exp Immunol* 1969;5:541–8.
- [71] Aftandeliaris R, Connor JD. Bactericidal antibody in serum during infection with *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* 1973;128:555–8.
- [72] Dolby JM, Stephens S. Pertussis antibodies in the sera of children exposed to *Bordetella pertussis* by vaccination or infection. *J Hyg* 1973;71:193–207.
- [73] Dolby JM, Vincent WA. Characterization of the antibodies responsible for the "bactericidal activity patterns" of antisera to *Bordetella pertussis*. *Immunology* 1965;8:499–510.
- [74] Glynn AA, Ward ME. Nature and heterogeneity of the antigens of *Neisseria gonorrhoeae* involved in the serum bactericidal reaction. *Infect Immun* 1970;2:162–8.
- [75] Ackers JP, Dolby JM. The antigen of *Bordetella pertussis* that induces bactericidal antibody and its relationship to protection of mice. *J Gen Microbiol* 1972;70:371–82.
- [76] Li ZM, Cowell JL, Brennan MJ, Burns DL, Manclark CR. Agglutinating monoclonal antibodies that specifically recognize lipooligosaccharide A of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1988;56:699–702.
- [77] Mountzouros KT, Kimura A, Cowell JL. A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis* reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with *B. pertussis*. *Infect Immun* 1992;60:5316–8.
- [78] Archambault D, Rondeau P, Martin D, Brodeur BR. Characterization and comparative bactericidal activity of monoclonal antibodies to *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide A. *J Gen Microbiol* 1991;137:905–11.
- [79] Shahin RD, Hamel J, Leef MF, Brodeur BR. Analysis of protective and non-protective monoclonal antibodies specific for *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide. *Infect Immun* 1994;62:722–5.
- [80] Gustafsson B, Lindquist U, Andersson M. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides. *J Clin Microbiol* 1987;26:188–93.
- [81] Kubler-Kielb J, Vinogradov E, Lagergård T, Ginzberg A, King JD, Preston A, et al. Oligosaccharide conjugates of *Bordetella pertussis* and *bronchiseptica* induce bactericidal antibodies, an addition to pertussis vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4087–92.
- [82] Pishko EJ, Betting DJ, Hutter CS, Harvill ET. *Bordetella pertussis* acquires resistance to complement-mediated killing in vivo. *Infect Immun* 2003;71:4936–42.
- [83] Le Blay K, Caroff M, Blanchard F, Perry MB, Chaby R. Epitopes of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides as potential markers for typing of isolates with monoclonal antibodies. *Microbiology* 1996;142:971–8.
- [84] Caroff M, Chaby R, Karibian D, Perry J, Deprun C, Szabo L. Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J Bacteriol* 1990;172:1121–8.
- [85] Gotto JW, Eckhardt T, Reilly PA, Scott JV, Cowell JL, Metcalf TN, et al. Biochemical and immunological properties of two forms of pertactin, the 69,000-molecular-weight outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1993;61:2211–5.
- [86] Plotkin SA, Cadoz M. The acellular pertussis vaccine trials: an interpretation. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:508–9.
- [87] Oliver DC, Fernandez RC. Antibodies to BrkA augment killing of *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2001;20:235–41.
- [88] Marr N, Oliver DC, Laurent V, Poolman J, Denoël P, Fernandez RC. Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* 2008;26:4306–11.
- [89] Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 1998;16:1901–6.
- [90] Taranger J, Trollfors B, Lagergård T, Sundh V, Bryla DA, Schneerson R, et al. Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis. *J Infect Dis* 2000;181:1010–3.
- [91] Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 2003;21:3542–9.
- [92] Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1998;16:1907–16.
- [93] Weiss AA, Patton AK, Millen SH, Ward JI, Bernstein DI, Chang S. Acellular pertussis vaccines and complement killing of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2004;72:7346–51.
- [94] Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:787–92.
- [95] Weingart C, Keitel W, Edwards K, Weiss A. Characterization of bactericidal immune responses following vaccination with acellular pertussis vaccines in adults. *Infect Immun* 2000;68:7175–9.
- [96] Locht C. Will we have new pertussis vaccines? *Vaccine* 2018;36:5460–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.055>.



ARTICLE

# IL-17-dependent SIgA-mediated protection against nasal *Bordetella pertussis* infection by live attenuated BPZE1 vaccine

Luis Solans<sup>1,2,3,4</sup>, Anne-Sophie Debie<sup>1,2,3,4</sup>, Lisa Borkner<sup>5</sup>, Nacho Aguiló<sup>6,7</sup>, Anaïs Thiriard<sup>1,2,3,4</sup>, Loïc Coutte<sup>1,2,3,4</sup>, Santi Uranga<sup>6,7</sup>, François Trottein<sup>1,2,3,4</sup>, Carlos Martín<sup>6,7</sup>, Kingston H. G. Mills<sup>5</sup> and Camille Locht<sup>1,2,3,4</sup>

BPZE1 is a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine for nasal administration to mimic the natural route of infection. Here, we studied the mechanism of BPZE1-induced immunity in the murine nasal cavity in contrast to acellular vaccine (aPV), although both vaccines protected against lung colonization. Transfer of splenocytes or serum from BPZE1-vaccinated or aPV-vaccinated mice protected naïve mice against lung colonization but not against nasal colonization. However, transfer of nasal washes from BPZE1-vaccinated mice resulted in protection against nasal colonization, which was lost in IgA-deficient or poly-Ig receptor-deficient mice, indicating that it depends on secretory IgA (SIgA) induction induced in the nose. BPZE1-induced protection against nasal colonization was long-lived despite the relatively rapid decay of SIgA, indicating a potent BPZE1-induced local memory response, likely due to CD4<sup>+</sup> tissue-resident memory T cells induced in the nose by BPZE1.

## INTRODUCTION

Pertussis or whooping cough is a severe and highly contagious respiratory disease, mainly caused by *Bordetella pertussis*.<sup>1</sup> Although it is most severe and can be life threatening in very young children, it also affects other age groups, and can cause significant morbidity in adolescents and adults, including the elderly.<sup>2</sup> Despite a current global vaccination coverage of >85%,<sup>3</sup> the disease has not been controlled in any country and has even made a spectacular comeback in areas where vaccine coverage has reached close to 100%,<sup>4</sup> illustrating the shortcomings of current vaccination programs.

Many reasons for this failure to control pertussis have been proposed, including pathogen adaptation to escape vaccine-induced immunity, fast waning of immunity, especially since the switch from whole-cell to acellular vaccines (aPV), and the failure of pertussis vaccines, in particular aPV, to prevent infection and spread of *B. pertussis*.<sup>5</sup> Several investigations have now shown that apparently symptomless *B. pertussis* infections are much more frequent than previously appreciated, even in fully vaccinated populations,<sup>6-10</sup> and recent modeling studies have suggested that asymptomatic transmission may be the major driver of the resurgence of pertussis.<sup>11</sup> In contrast to current vaccines, prior infection is able to prevent *B. pertussis* infection and transmission, as shown in baboon studies.<sup>12</sup>

We have developed a live attenuated *B. pertussis* vaccine to be delivered nasally. This vaccine, named BPZE1, was constructed by genetically removing or inactivating three toxins: tracheal cytotoxin, dermonecrotic toxin, and pertussis toxin (PTX).<sup>13</sup> It was found to be safe in pre-clinical models and highly effective in protecting mice against *B. pertussis* after a single nasal administration (for a review see Loch and Mielcarek et al..<sup>14</sup>) It is now in clinical development and was shown to be safe in humans, able to transiently colonize the human respiratory tract and to induce immune responses in all colonized individuals.<sup>15</sup>

It has recently been tested in baboons, where it induced strong protection against pertussis disease after a single vaccination and reduced nasopharyngeal *B. pertussis* colonization by 99.998% over non-vaccinated baboons,<sup>16</sup> a performance that by far exceeded that of three administrations of a human dose of aPV and whole-cell vaccine.<sup>12</sup> However, the mechanism responsible for the protection against nasal colonization has not been addressed yet. In this study, we used the mouse model to examine the immune mechanism of BPZE1-mediated protection against nasal infection by *B. pertussis*, which allowed us to identify *B. pertussis*-specific secretory IgA (SIgA) in the nasal cavity as the main effector molecule for nasal protection.

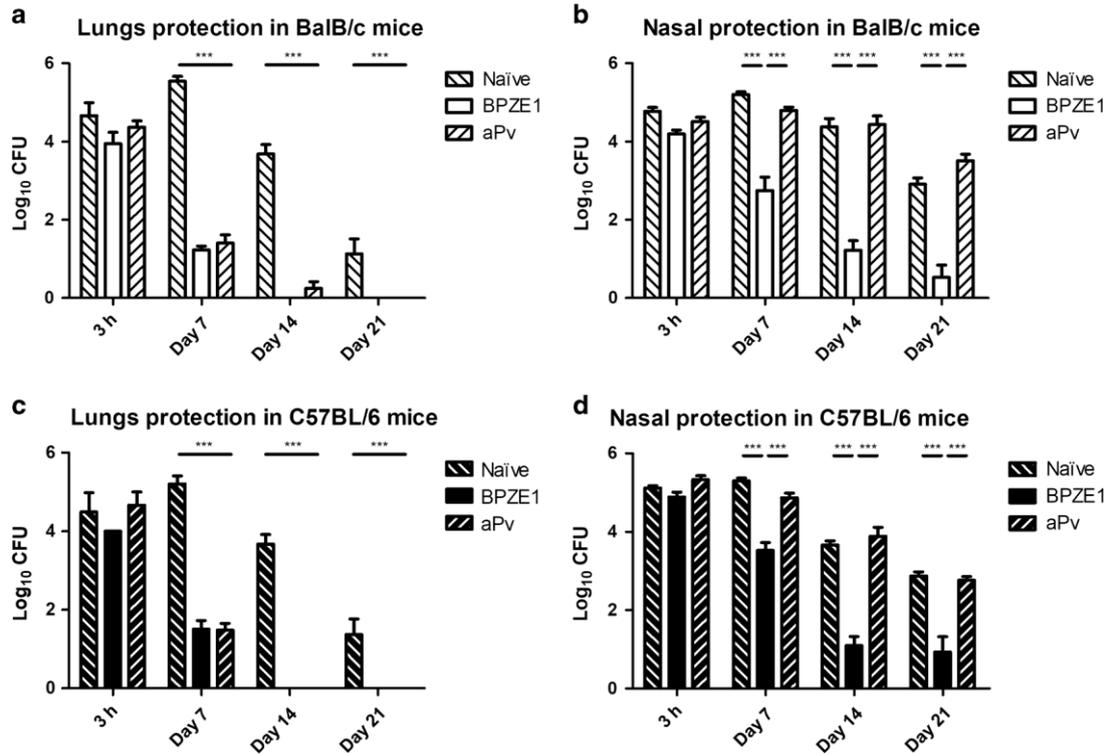


Fig. 1 Protection induced by BPZE1 or aPV against *B. pertussis* colonization of Balb/c and C57BL/6 mouse lungs and noses. Groups of Balb/c or C57BL/6 mice were vaccinated once with BPZE1 or twice with aPV at a 4-week interval. Eight weeks after the first vaccination, mice were challenged with *B. pertussis* BPBCTA1 and CFU levels were measured at the indicated time points in the lungs (a, c) and noses (b, d) of Balb/c (a, b) and C57BL/6 (c, d) mice.  $N = 3$  for the 3 h time point and  $N = 5$  for the other time points. Bars represent mean values and graph represents data combined from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$  by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test

## RESULTS

### *BPZE1, but not aPV, induces protection against nasal infection by B. pertussis*

In most published studies using mice to evaluate the potency of pertussis vaccines, the animals were infected intranasally or by aerosol, and the bacterial burden in the lungs was determined at different time points. This model, in which mice receive two administrations of 1/5 of a human aPV dose, is routinely used as it correlates with aPV efficacy in human clinical trials.<sup>17, 18</sup> When Balb/c (Fig. 1a, b) and C57BL/6 (Fig. 1c, d) mice were vaccinated with a single nasal dose

of  $10^6$  colony-forming unit (CFU) BPZE1, a dose established according to previous dose-responses studies,<sup>19</sup> or two administrations of 1/5 of a human aPV dose at a 4-week interval and challenged with virulent *B. pertussis* BPBCTA1 8 weeks after the first vaccination, strong protection with either vaccine was seen in the lungs (Fig. 1a, c), as expected from previous studies.<sup>13</sup>

However, when the bacterial load in the noses were examined, BPZE1 was found to induce strong protection against nasal colonization by virulent *B. pertussis*, whereas aPV failed to control the infection in the nasal cavity (Fig. 1b, d). Three hours after challenge infection, colony counts in the noses were similar to

those detected in the lungs, which is different from other studies. These differences may be due to the fact that here the mice were infected by nasal drops in contrast to aerosol infection in other studies. Nasal drops may more efficiently lead to nasal colonization. Furthermore, we have examined total bacterial burden in nasal homogenates, compared to other studies in which nasal washes (NWs) were examined. When we compared NW to nasal homogenates, we indeed saw a roughly 10-fold lower CFU recovery in the NW (data not shown).

*Transfer of immune serum or splenocytes from vaccinated mice provides protection in the lungs but not in the nose*

The analysis of Balb/c serum antibody responses to whole *B. pertussis* extracts revealed that nasal administration of BPZE1 induced both serum immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin A (IgA), whereas subcutaneous administration of aPV only induced serum IgG (Fig. 2a, b). The IgG isotypes induced by the two vaccines were also different. Whereas aPV primarily induced serum anti-*B. pertussis* IgG1 (Fig. 2c), indicative of a T-helper 2 (Th2)-type immune response, the IgG isotype of the BPZE1-vaccinated mice was primarily IgG2a (Fig. 2d), IgG2b (Fig. 2e), and IgG3 (Fig. 2f), indicative of Th1-type and Th17-type immune responses. This is consistent with our previous results showing that aPV and BPZE1 preferentially induce Th2-producing and Th1 cytokine-producing T cells upon stimulation with *B. pertussis* antigens, respectively.<sup>13</sup>

Interestingly, we found here that aPV preferentially induced IL-17 responses to PTX and filamentous hemagglutinin (FHA), whereas BPZE1 preferentially induced IL-17 to pertactin, especially in the lungs, but also, to a minor degree, in the spleen (Supplementary Figure 1). Similar IgG isotype profiles were seen in C57BL/6 mice (Supplementary Figure 2). When antibodies were measured against the three antigens present in aPV, FHA, PTX, and pertactin, IgG were measurable against all three antigens both in BPZE1-vaccinated and aPV-vaccinated mice, whereas IgA could only be detected against pertactin in BPZE1-vaccinated mice, both in Balb/c (Supplementary Figure 3) and in C57BL/6 mice (Supplementary Figure 4).

In order to assess the protective effect of these antibodies against nasal infection by *B. pertussis*, serum from aPV-vaccinated or BPZE1-vaccinated mice was injected intraperitoneally into severe combined immunodeficiency (SCID) mice, which were intranasally challenged with virulent BPSM 24 h later. Whereas the transfer of either serum resulted in significant protection in the lungs, compared to transfer of serum from naïve mice (Fig. 3a), none of them conferred protection in the nose (Fig. 3b).

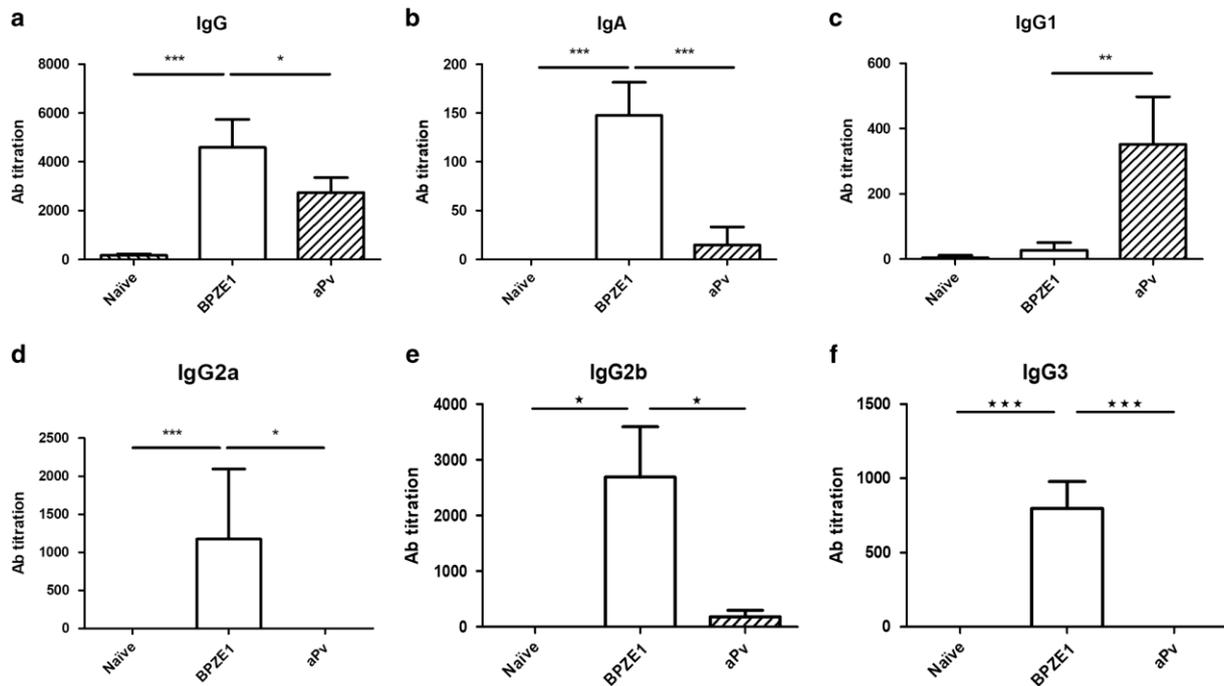


Fig. 2 Serum antibody induction by BPZE1 or aPV vaccination in Balb/c mice. Groups of Balb/c mice were vaccinated once with BPZE1, twice with aPV at a 4 weeks interval, or left unvaccinated (Naive) as indicated. Eight weeks after the first vaccination, mice were sacrificed and serum was collected. Total IgG (a), IgA (b), IgG1 (c), IgG2a (d), IgG2b (e), and IgG3 (f) titers were measured against BPSM lysate protein extract.  $N = 5$ . Bars represent mean values and graph represents data combined from three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  by one-way ANOVA and Bonferroni post hoc test

Since protection against *B. pertussis* may also be cell-mediated,<sup>20</sup> we also examined the protective effect of splenocyte transfer. Similar to the antisera, splenocytes from mice vaccinated with either BPZE1 or aPV transferred significant levels of protection to SCID mice in the lung, whereas splenocytes from naïve mice did not (Fig. 3c). In contrast, none of them transferred protection in the nasal cavity (Fig. 3d), although a trend of a decreased bacterial burden was seen when splenocytes from BPZE1-vaccinated mice were transferred. However, this did not reach statistical significance.

#### *Transfer of sIgA in NWs from BPZE1-vaccinated mice provides protection against nasal B. pertussis infection*

Since neither serum antibodies nor spleen cells from BPZE1-vaccinated mice could transfer protection against nasal infection by *B. pertussis*, we reasoned that nasal protection may require the induction of local antibodies by the vaccine. We first measured anti-*B. pertussis* antibodies in the nasal secretions of BPZE1-vaccinated mice. As shown in Fig. 4a, BPZE1 vaccination induced barely detectable anti-*B. pertussis* IgG levels in NWs, whereas significant amounts of anti-*B. pertussis* IgA titers were induced (Fig. 4b). These IgA were genuine SIgA, as they were not detected in NWs of polymeric immunoglobulin receptor-deficient (*Pigr*<sup>-/-</sup>) mice (Fig. 4a, b).

NWs from BPZE1-vaccinated mice were then instilled into the noses of naïve mice, which were subsequently challenged with

virulent *B. pertussis*. Seven days after infection, the bacterial load in the noses of these recipient mice was significantly lower than in the noses of mice that had received NW from naïve mice (Fig. 4c). No protection was seen when NW from BPZE1-vaccinated *Pigr*<sup>-/-</sup> mice were transferred to naïve mice, indicating that the protection depended on antibodies actively transported via pIgR.

#### *BPZE1-induced protection against nasal B. pertussis infection depends on SIgA*

As significant BPZE1-induced protection against nasal infection by *B. pertussis* could be transferred by anti-*B. pertussis* IgA-containing NWs, we further investigated the role of pIgR on BPZE1-mediated protection in the nose. C57BL/6 and *Pigr*<sup>-/-</sup> mice were intranasally vaccinated with BPZE1 and challenged 2 months later with BPBCTA1. Three hours after challenge, vaccinated and non-vaccinated mice contained the same bacterial burden in the nose (Fig. 5). A significant decrease in bacterial load was observed in the vaccinated C57BL/6 mice 7 and 21 days after infection, compared to the non-vaccinated mice, whereas this decrease was much less pronounced in the *Pigr*<sup>-/-</sup> mice, indicating that the active transport of immunoglobulins into the mucosal lumen is important for nasal protection.

Since in addition to IgA pIgR can also transport other immunoglobulin isotypes, it was important to confirm the role of IgA in nasal protection. We therefore vaccinated *IgA*<sup>-/-</sup> mice with BPZE1 and measured the bacterial burden after challenge with virulent *B. pertussis* BPBCTA1. Seven and twenty-one days after infection with BPBCTA1, the *IgA*<sup>-/-</sup> mice were significantly less protected than the C57BL/6 mice (Fig. 5). Together, these results demonstrate that BPZE1-induced protection against nasal infection by *B. pertussis* is mediated by SIgA secreted into the nasal cavity. There was no difference in BPZE1-mediated protection between *IgA*<sup>-/-</sup> and *Pigr*<sup>-/-</sup> mice at day 7 after infection, and a slight but significant difference was seen at day 21 after infection (slightly better protection in the *IgA*<sup>-/-</sup> than in the *Pigr*<sup>-/-</sup> mice). It is thus likely that isotypes other than IgA may contribute to protection against nasal infection by *B. pertussis*, but this would best be at a lesser extent.

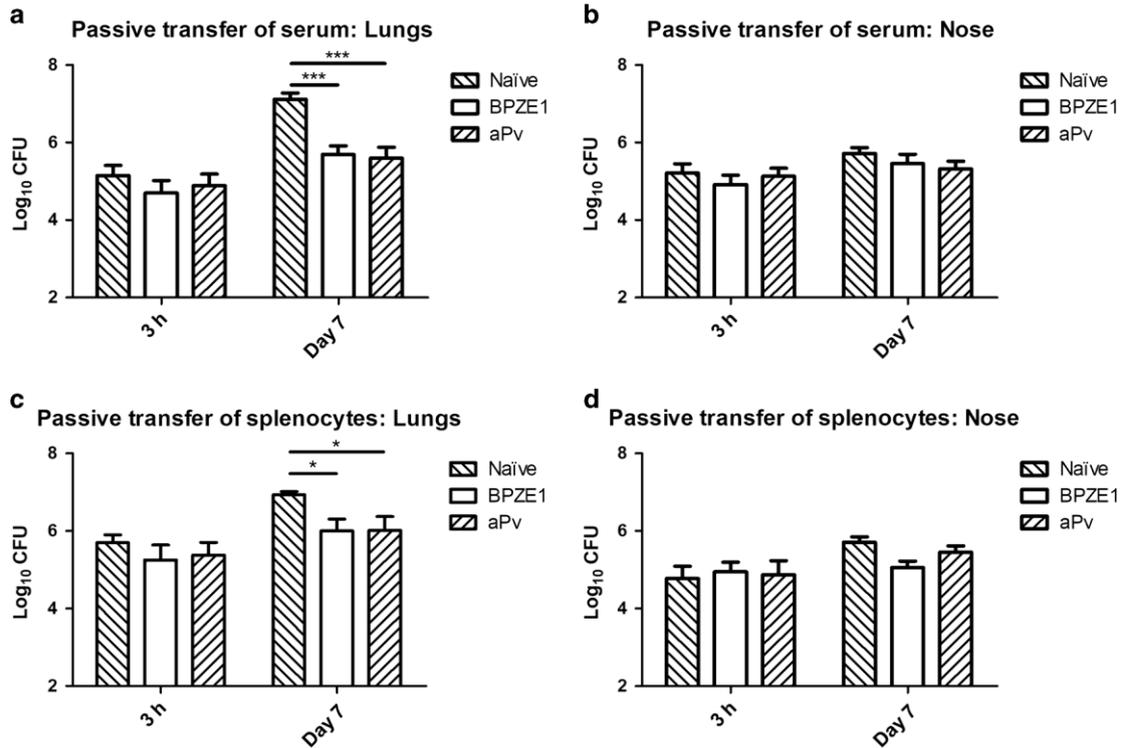


Fig. 3 Protection by passive transfer of serum and splenocytes from BPZE1-vaccinated or aPV-vaccinated Balb/c mice in SCID mice. Balb/c mice were vaccinated once with BPZE1 and twice with aPV at a 4-week interval (naïve) as indicated. Eight weeks after the first vaccination, mice were sacrificed and serum and splenocytes were collected and transferred intraperitoneally into SCID mice. Twenty-four hours later SCID mice were challenged with *B. pertussis* BPSM and CFU counts were measured in the lungs (a, c) and the noses (b, d) of the mice which had received the serum (a, b) or the splenocytes (c, d).  $N = 3$  for the 3 h time point and  $N = 5$  for the day 7 time point. Bars represent mean values and graph represents data combined from three independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test

### Long-term persistence of BPZE1-induced protection in the nasal cavity

In order to study the persistence of BPZE1-induced protection in the nasal cavity, Balb/c and C57BL/6 mice were vaccinated with a single dose of BPZE1 and challenged with virulent *B. pertussis* 10 months after vaccination. Significant protection against nasal colonization by *B. pertussis* was still observed for both mouse strains 10 months after vaccination (Fig. 6a, c), although long-term protection appeared to be stronger in Balb/c mice than in C57BL/6 mice.

However, when NWs from Balb/c or C57BL/6 mice vaccinated 10 months earlier were transferred intranasally into naïve mice prior to challenge, no difference in bacterial burden was observed 7 days after challenge between mice that had received NWs from vaccinated mice and those that had received NWs from naïve mice (Fig. 6b, d). Furthermore, *B. pertussis*-specific IgA had dropped to background levels 10 months after BPZE1 vaccination (Supplementary Figure 5A). Together, these observations are consistent with the notion that IgA are relatively short-lived,<sup>21</sup> but that, in contrast, the memory of mucosal immunity is long-lived.<sup>22</sup>

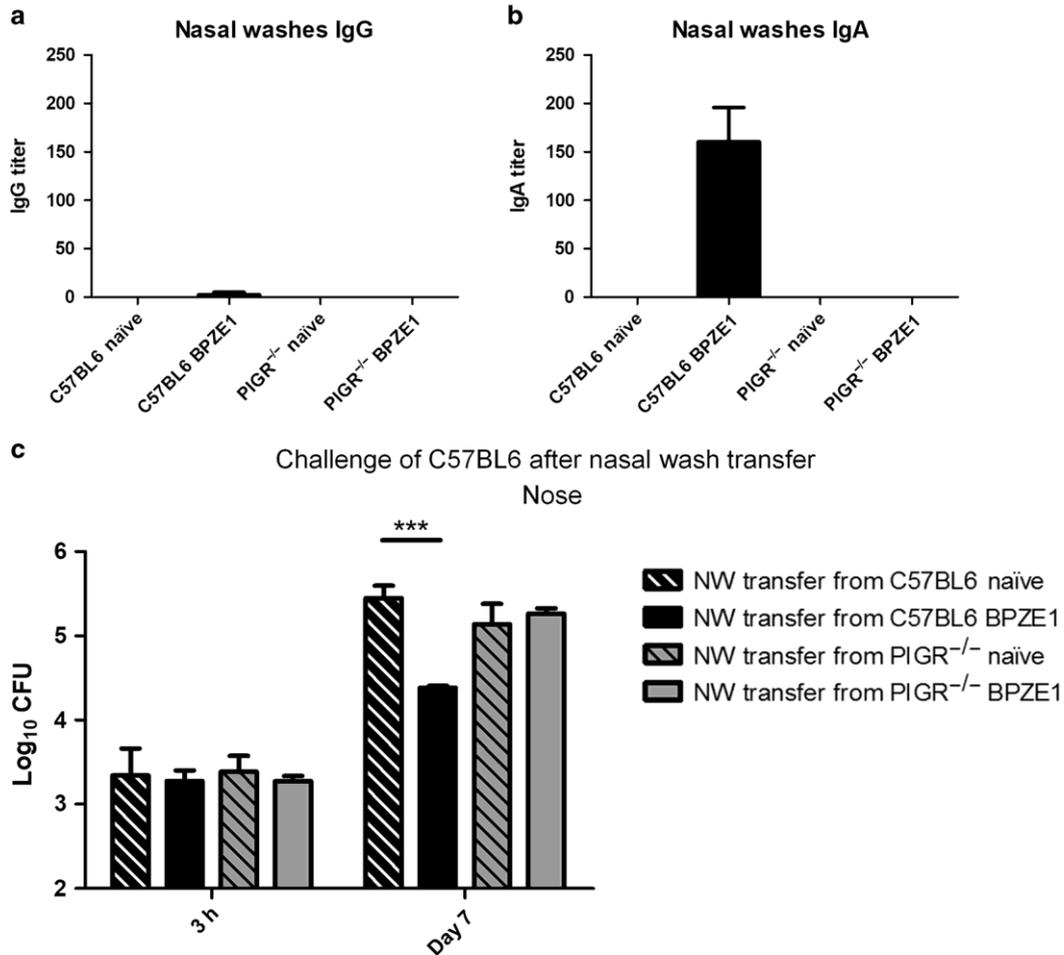


Fig. 4 Antibody titers in nasal washes and protection by passive transfer of nasal washes against nasal colonization by *B. pertussis*. Groups of C57BL/6 and C57BL/6 *Pigr*<sup>-/-</sup> mice were vaccinated with BPZE1 or left unvaccinated (naïve) as indicated. Four weeks later, mice were sacrificed and nasal washes were collected. Total IgG (a) and IgA (b) titers were measured against BPSM lysate.  $N = 5$ . The nasal washes were transferred intranasally into naïve C57BL/6 mice, followed by challenge with  $5 \times 10^4$  CFU virulent *B. pertussis* BPSM. CFU levels were measured in the nose at the indicated time points (c).  $N = 3$  for the 3 h time point and 5 for the day 7 time point. Bars represent mean values and graph represents data combined from three independent experiments \*\*\* $p < 0.001$  by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test

#### BPZE1 induces resident memory T cells in the nose

Virulent *B. pertussis* infection has been shown to induce resident memory T (Trm) cells in the lungs of mice.<sup>23</sup> As these cells are

long lived and can rapidly expand upon secondary antigen encounter, they may be the prime candidates to sustain mucosal immune memory. We therefore examined the ability of BPZE1 to induce Trm cells in the nose. The numbers of Trm cells, as defined by the CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> phenotype were increased 14 days after BPZE1 administration in both Balb/c and C57BL/6 mice (Fig. 7a, b). Furthermore, the Trm cells produced IL-17 and, to a lesser extent, IFN- $\gamma$  (Fig. 7c, d).

#### BPZE1-induced nasal protection depends on IL-17

Since BPZE1 induces IL-17-producing Trm in the noses of mice, we next determined the role of IL-17 in BPZE1-mediated nasal

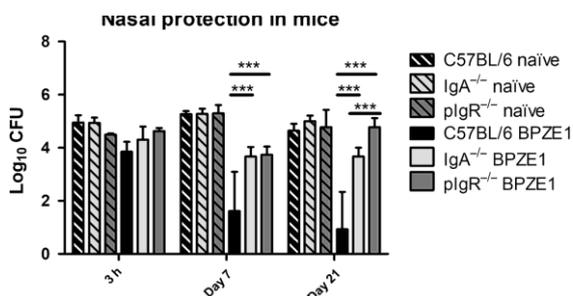


Fig. 5 BPZE1-induced protection against nasal colonization by *B. pertussis* in C57BL/6 mice and *IgA*<sup>-/-</sup> and *Pigr*<sup>-/-</sup> strains. Groups of C57BL/6, C57BL/6 *IgA*<sup>-/-</sup>, and C57BL/6 *Pigr*<sup>-/-</sup> mice were vaccinated with BPZE1 or left unvaccinated (naïve) as indicated, and 8 weeks later, mice were challenged with *B. pertussis* BPBCTA1 and CFU levels were measured in the nose at the indicated time points. *N* = 3 for the 3 h time point and *N* = 5 for the other time points. Bars represent mean values and graph represents data from a representative experiment. \*\*\**p* < 0.001 by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test

protection. We thus vaccinated *Il17*<sup>-/-</sup> mice with BPZE1 and measured the bacterial load in the noses 3 h and 7 days after challenge with virulent *B. pertussis* BPBCTA1. All mice, vaccinated or not, contained comparable amounts of BPBCTA1 bacteria in the nose 3 h after infection. At day 7 after infection, the vaccinated *Il17*<sup>-/-</sup> mice carried significantly more BPBCTA1 organisms in their noses than the vaccinated C57BL/6 mice (Fig. 8). Anti-*B. pertussis* IgA levels in the NWS of BPZE1-vaccinated *Il17*<sup>-/-</sup> mice were substantially reduced (Supplementary Figure 5B). However, protection was not completely abolished by the lack of IL-17, since compared to the non-vaccinated animals, vaccinated *Il17*<sup>-/-</sup> mice still contained approximately two orders of magnitude less CFU in their noses at day 7 after infection, as was also seen in the *Pigr*<sup>-/-</sup> and in the *IgA*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 8).

## DISCUSSION

Pertussis is essentially an upper respiratory disease, and the bacteria can be found in large numbers mostly between the cilia on the surface of the epithelial cells lining the trachea,<sup>1</sup> although in severe cases patients may suffer from bronchopneumonia, which may be due to secondary infections or to *B. pertussis* itself.<sup>24</sup> *Bordetella pertussis* initiates its infection by attachment to the epithelial cells of the upper airway, thereby qualifying it as a typical mucosal pathogen. Therefore, it would be expected that the mucosal immune responses influence the outcome of the infection. However, surprisingly, most studies on adaptive immunity to pertussis have initially focused first on serum antibody responses, and then on circulating T cells in humans and splenocytes in mice.<sup>25</sup> Mucosal antibody and T cell responses have so far attracted comparably little attention, although SIgA have been detected in mucosal secretions of *B. pertussis*-infected humans,<sup>26</sup> and previous studies have suggested that they may contribute to protection.<sup>27</sup> However, in other studies *B. pertussis* antigens formulated with mucosal adjuvants and delivered nasally to induce SIgA in mice did not confer better protection than when delivered parenterally.<sup>25</sup> Furthermore, using *IgA*<sup>-/-</sup> mice it has been suggested that IgA are not critical for protection of mice against nasal colonization by *B. pertussis*, although they appeared to be involved in reducing nasal infection, but not lung infection, by closely related *Bordetella bronchiseptica*.<sup>28</sup>

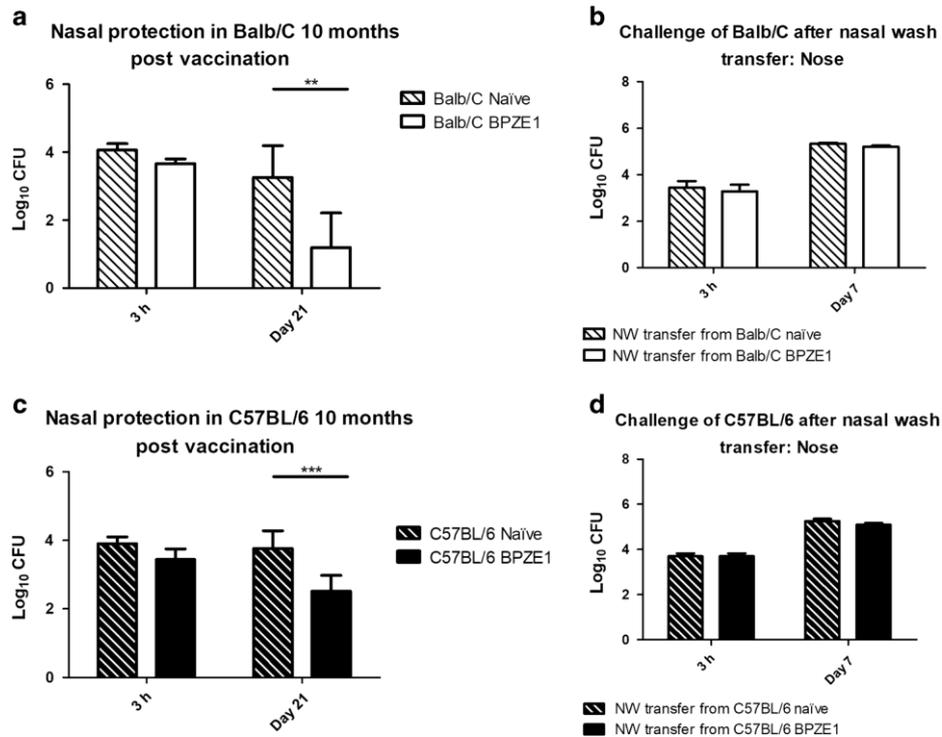
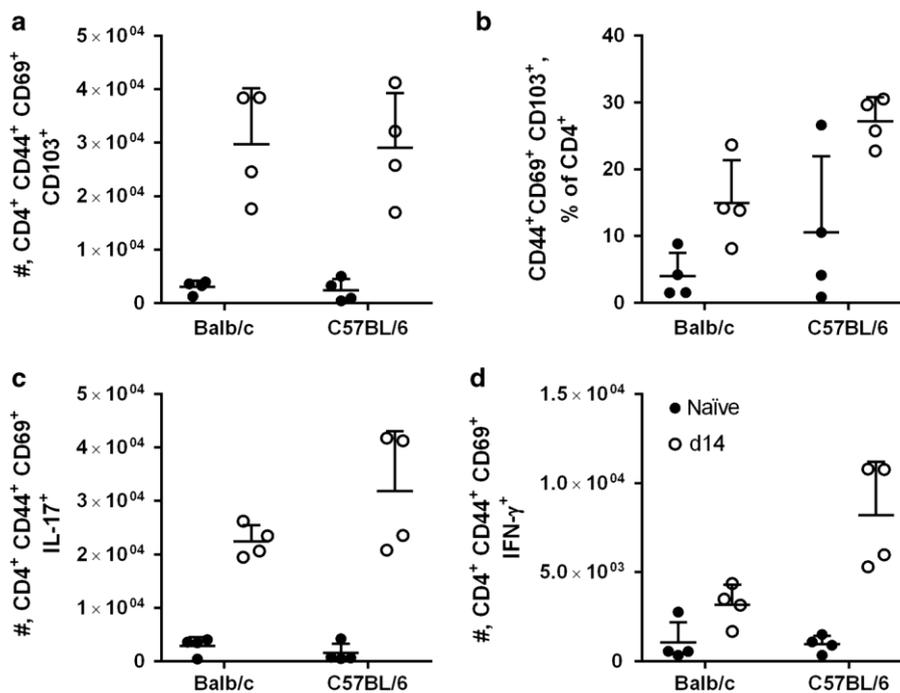


Fig. 6 BPZE1-mediated long-term protection against nasal colonization by *B. pertussis* in Balb/c and C57BL/6 mice. Groups of Balb/c and C57BL/6 mice were vaccinated with BPZE1 or left unvaccinated (naïve) as indicated. Ten months later, mice were challenged with *B. pertussis* BPBCTA1 and nasal CFU levels were measured at the indicated time points in Balb/c (a) and C57BL/6 (c) mice. Ten months after vaccination, mice were sacrificed and nasal washes were collected and transferred intranasally into naïve Balb/c (b) or C57BL/6 (d) followed by challenge with  $5 \times 10^4$  CFU virulent *B. pertussis* BPSM. CFU levels were measured in the nose at the indicated time points.  $N = 3$  for the 3 h time point and  $N = 5$  for the other time points. Bars represent mean values and graph represents data from a representative experiment. \*\*\* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$  by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test

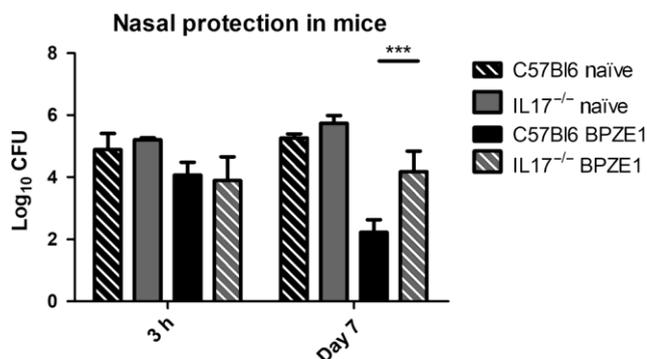
However, more recently, Raeven et al.<sup>29</sup> have shown that pulmonary immunization with pertussis outer membrane vesicles induced superior protection than subcutaneous immunization and this was related to mucosal IgA and Th17 cell induction. The same authors have shown that mucosal IgA and Th1/Th17 cells are also induced by experimental infection of mice with virulent *B. pertussis*,<sup>30</sup> and Th1/Th17 cells have been demonstrated to be crucial for protection induced by infection.<sup>31</sup> Furthermore, Wilk et al.<sup>23</sup> and

Misiak et al.<sup>32</sup> have reported that infection with virulent *B. pertussis* induces tissue-resident IL-17-producing CD4 and  $\gamma\delta$  T cells in the lungs of mice. However, all these studies examined pulmonary or systemic T cell or IgA responses, and none of them addressed the responses in the nasal cavity. Here, we found that aPV given subcutaneously protected mice very well against *B. pertussis* colonization of the lungs, although it did not induce any appreciable levels of serum IgA.



**Fig. 7** Tissue-resident memory T (Trm) cells in nasal tissue post infection with BPZE1. C57BL/6 and Balb/c mice were infected intranasally with  $10^6$  CFU BPZE1. Prior to (naïve) and 14 days post infection (d14), mice were i.v. injected with anti-CD45-PE antibody 10 min before euthanasia. Nasal tissue was taken and the T cell response was analyzed by flow cytometry. Only tissue-resident cells (CD45-PE negative) were included in the analysis. **a** Absolute counts of CD4<sup>+</sup> Trm (CD45<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>), **b** percentages of Trm (CD45<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>) of total CD4<sup>+</sup> T cells, **c** absolute counts of IL-17-producing CD4<sup>+</sup> Trm, **d** absolute counts of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> Trm. The lines indicate the means, the error bars show the SD

**Fig. 8** BPZE1-mediated protection against nasal colonization by *B. pertussis* in C57BL/6 and *Il17*<sup>-/-</sup> mice. Groups of C57BL/6 and C57BL/6 *Il17*<sup>-/-</sup> mice were vaccinated with BPZE1 or left unvaccinated (naïve) as indicated. Eight weeks later, mice were challenged with *B. pertussis* BPBCTA1 and CFU levels were measured in the nose at the indicated time points.  $N = 3$  for the 3 h time point and  $N = 5$  for the day 7 time point. Bars represent mean values and graph represents data from a representative experiment. \*\*\* $p < 0.001$  by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test



In contrast, aPV provided no protection against *B. pertussis* colonization in the nasal cavity of the mice. This is reminiscent with what has been reported in the baboon model.<sup>12</sup> It is also consistent with epidemiological studies in humans indicating that the currently used pertussis vaccines do not prevent nasopharyngeal *B. pertussis* infection and transmission.<sup>33</sup> Incidentally, this may be the main reason for the failure of cocoon vaccination strategies to protect newborns against pertussis, even in settings in which these strategies have been successfully implemented.<sup>34</sup>

In contrast to aPV, a single dose of BPZE1 delivered nasally induced serum and local anti-*B. pertussis* IgA responses in addition to serum IgG and provided strong protection against *B. pertussis* colonization of both the lungs and the nose. This is in contrast to a previous study showing that prior infection with *B. pertussis* did not prevent subsequent nasal colonization by the same organism.<sup>28</sup> The reasons for these conflicting findings are not known, but may potentially be due to the fact that we used the genetically attenuated BPZE1 strain, whereas in the previous study, virulent *B. pertussis* was used for the initial infection.

However, our findings are consistent with our previous study showing BPZE1-induced protection against nasal infection in baboons,<sup>16</sup> in contrast to aPV.<sup>12</sup> In the mice, the nasal anti-*B. pertussis* IgA induced by BPZE1 were genuine SIgA, as they were not induced in *Pigr*<sup>-/-</sup> mice, lacking the secretory component and therefore unable to actively secrete IgA into the mucosal lumen.

Consistent with a previous study,<sup>35</sup> BPZE1-induced or aPV-induced serum antibodies and splenocytes were able to transfer a significant level of protection against pulmonary infection by *B. pertussis* to naïve mice. We have previously shown that BPZE1-mediated protection by passive transfer of splenocytes is essentially due to CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>35</sup> However, here we found that none of them transferred any detectable level of protection against nasal colonization. Significant protection against nasal colonization could only be transferred by NWs from BPZE1-vaccinated mice. Again, this depended on SIgA, as NWs from BPZE1-vaccinated *Pigr*<sup>-/-</sup> mice did not transfer protection. Consistently, BPZE1 failed to protect against nasal *B. pertussis* infection in *Pigr*<sup>-/-</sup> and in *IgA*<sup>-/-</sup> mice, indicating that both the IgA isotype and their active transport into the airway lumen are required for protection against nasal carriage.

Mathematical modeling studies have concluded that asymptomatic carriage and transmission of *B. pertussis* may be the most parsimonious reason for the current resurgence of pertussis in high vaccine coverage countries.<sup>11</sup> Our data suggest that in order to prevent asymptomatic carriage and consequently transmission of *B. pertussis*, the induction of potent SIgA responses in the nasopharynx may be required, and that this can be achieved by nasally delivered live attenuated pertussis vaccines, such as BPZE1. However, compared to IgG, IgA have a relatively short half-life,<sup>21</sup> and an additional major problem of the current pertussis vaccines is the short duration of immunity elicited.<sup>36</sup> We have previously shown that a single nasal dose of BPZE1 induces very long-lived protection against lung colonization by *B. pertussis*.<sup>37</sup>

Here we show that it also induced long-term protection against nasal infection, as 10 months after a single nasal dose of BPZE1 the mice still showed significant protection against nasal carriage. In contrast, NW harvested 10 months after vaccination failed to transfer any significant level of protection against nasal colonization, and *B. pertussis*-specific IgA levels in the NW had fallen to background levels 10 months after BPZE1 vaccination.

These observations indicate that in spite of the relatively fast IgA decay in the nasopharynx, mucosal immune memory persists for a long time, potentially due to long-lived local IgA plasma cells.<sup>22</sup> In order for these cells to produce the *B. pertussis*-specific IgA upon challenge infection, they are likely to require help from memory T cells. IL-17-producing Th17 cells have been implicated in both the IgA switch of plasma cells<sup>38</sup> and the induction of pIgR,<sup>39</sup> thereby optimizing SIgA production. We found that BPZE1 induces IL-17-producing CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> Trm cells in the nose and that *Il17*<sup>-/-</sup> mice were much less protected against nasal infection by *B. pertussis* upon BPZE1 vaccination. Furthermore, their level of specific IgA in the NWs was much reduced, compared to the NWs of BPZE1-vaccinated wild-type mice. These observations suggest that BPZE1-induced protective SIgA is dependent on IL-17-producing Trm cells. As they are long lived, it is therefore likely that these cells participate in sustaining BPZE1-induced immune memory against nasal infection. In that regard, it is interesting to note that the long-term protection offered by BPZE1 vaccination against nasal infection was stronger in Balb/c mice than in C57BL/6 mice (see Fig. 6a, c), which is in line with the recent observation that splenocytes from Balb/c mice produce more IL-17 upon stimulation with *B. pertussis* antigens than splenocytes from C57BL/6 mice.<sup>40</sup>

Long-lived IL-17-producing Th17 memory T cells have also been detected in the respiratory mucosa of *B. pertussis*-infected baboons,<sup>41</sup> suggesting that the observations made in the mouse model can also be extended to primates. The *B. pertussis*-specific IL-17-producing memory T cells persisted for at least 2 years after infection of the baboons. We have recently found that BPZE1 can also induce IL-17 responses in baboons and that high levels of antigen-specific Th17 cells were associated with high IgA responses against the surface antigen pertactin and strong sterilizing immunity in the baboon nasopharynx (CL, unpublished). It is not yet known whether BPZE1 also induces local Th17 lymphocyte responses in the nasopharynx of humans. However, ex vivo studies have shown that BPZE1 can stimulate human monocyte-derived dendritic cells towards a Th17-polarizing phenotype, in a T cell-contact-dependent manner,<sup>42</sup> which was shown to influence antiviral immune responses.<sup>43</sup>

In conclusion, we have found that, in contrast to aPV, BPZE1, in addition to protection against lung colonization, induces strong protective immunity against nasal colonization by *B. pertussis*. BPZE1-mediated protection was dependent on the induction of specific SIgA secreted into the nasal cavity and on IL-17, most likely produced by Trm cells that appear to play a key role in sustaining mucosal adaptive immune memory elicited by nasal vaccination with BPZE1. Since the two major limitations of the current aPV are their inability to prevent *B. pertussis* infection and transmission and their short-lived immunity elicited, a vaccine, such as BPZE1, that provides both potent SIgA-based mucosal immunity in the nasopharynx and that induces strong and long-lasting local Th17 cell-based memory has the potential to be a major tool for the ultimate control of whooping cough

## METHODS

### *Bacterial strains and culture conditions Bordetella pertussis*

BPZE1,<sup>13</sup> BPSM,<sup>44</sup> and BPBCTA1, a BPSM derivative containing pFUS2 integrated in the *bctA1* gene,<sup>45</sup> used in this study, were cultured at 37 °C on Bordet–Gengou (BG) agar, supplemented with 1% glycerol and 10% defibrinated sheep blood, as described.<sup>13</sup> After growth, the bacteria were harvested by scraping the plates and resuspending them in phosphate-buffered saline (PBS) at the desired density. When required, streptomycin was used at 100 µg/ml and gentamycin at 10 µg/ml.

### *Protection experiments*

Balb/c and C57BL/6 mice were purchased from Charles Rivers, *IgA*<sup>-/-</sup><sup>46, 47</sup> and *Pigr*<sup>-/-</sup> mice<sup>48</sup> came from University of Zaragoza, and the SCID and *Il17*<sup>-/-</sup> mice were provided by Institute Pasteur of Lille. To determine the BPZE1-protective efficacy, eight 6-week-old wild-type mice were intranasally vaccinated with 10<sup>6</sup> viable BPZE1 or vaccinated subcutaneously with 1/5 of the human dose of aPV (Infanrix®, GlaxoSmithKline) and boosted 4 weeks later with the same dose, as described previously.<sup>13</sup> Unvaccinated mice served as control. Eight weeks after the first vaccination, the mice were challenged intranasally with 10<sup>6</sup> CFU of virulent BPSM or BPBCTA1. Three hours post challenge (day 0), 3 mice per group were sacrificed, and their lungs were harvested and homogenized for CFU measurement by plating 10-fold serial dilutions onto BG agar plates containing 10 µg/ml gentamycin, as previously described.<sup>13</sup> In parallel, the noses of the mice were harvested as follows. Euthanized mice are put on their backs. After pulling off the nostril skin with tweezers, an incision was made on each

side of the head between the nostrils and the cheeks and following the side of the head up to the neck to remove the skin from the top of the head. Then, an incision was made on each side of the head to cut and remove the lower jaw. Finally, incisions at the base of the palate and on each side of the head were made to remove the part of the head containing the nasal cavities. Residual skin, eye-ball, and cheek muscle were carefully removed from the recovered tissues. The remaining material was then homogenized and plated out in serial dilutions as described above for the lungs.<sup>13</sup> Five mice per group were then treated similarly at the indicated time points. For long-term protection experiments, eight 6-week-old mice were vaccinated with 10<sup>6</sup> CFU BPZE1 or left unvaccinated to serve as control. Ten months later, mice were challenged intranasally with 10<sup>6</sup> CFU of virulent BPBCTA1 and bacterial load was measured as described above at 3 h and 21 days post infection.

### *Passive transfer experiments*

Groups of eight 6-week-old Balb/c mice were vaccinated with BPZE1 or aPV as described above. Eight weeks after the first vaccination, the mice were euthanized, and spleen and blood were collected. Splenocytes and sera were purified as described elsewhere before.<sup>37</sup> One hundred microliters of serum or 5 × 10<sup>7</sup> total spleen cells were transferred intraperitoneally into SCID mice, which were challenged intranasally with 10<sup>6</sup> CFU of virulent BPBCTA1 24 h later. CFUs were measured at the indicated time points in the lungs and noses as described above. For passive transfer of mucosal antibodies, eight 6-week-old mice were vaccinated intranasally by BPZE1 or left unvaccinated.

Four weeks or 10 months later, the mice were euthanized and the NW were harvested by flushing PBS with a cocktail of anti-proteases complete mini (Roche) through the nose and concentrating the washes by using 10-kDa cut-off Amicon® Ultra columns (Millipore) following the manufacturer's instructions. Five micro-liters of the concentrated NW was then transferred intranasally into the noses of 6-week-old naïve C57BL/6 mice, followed by intranasal challenge with  $5 \times 10^4$  CFU virulent BPSM and CFU counting in the nose 3 h and 7 days post challenge as described above. We used an approximately 10-fold lower challenge dose compared to the other challenge experiments, as due to the low amount of antibodies in the NW, a high challenge dose would have been too overwhelming to see a potential protective effect of NW antibodies.

#### *Antibody titer determination*

To determine antibody titers in the sera and NWs, standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) protocols were used. Briefly, 96-well plates (Nunc) were coated with 1 µg per well of total *B. pertussis* BPSM lysate or 1 µg per well PTX, FHA, or pertactin and then blocked with 2% bovine serum albumin in PBS/0.5% Tween. BPSM lysates were prepared from a 200-ml bacterial culture grown in Stainer Scholte medium until stationary phase. The bacteria were then harvested by centrifugation, resuspended in 10 ml PBS with a cocktail of anti-proteases complete mini (Roche), and lysed by serial passages through the French press. The protein concentration was quantified using BCA test (Thermo Fisher) following the manufacturer's instructions.

The coated plates were then incubated for 2 h at 37 °C with serum or NW samples in twofold serial dilutions in PBS/0.5% Tween. After three washes with PBS/0.5% Tween, horse radish peroxidase (HRP)-goat anti-mouse IgG (1:5000) (Sigma), HRP-goat anti-mouse IgA (1:500) (Sigma), HRP-goat anti-mouse IgG1 (1:1000) (Southern Biotech), or HRP-goat anti-mouse IgG2a (1:20,000) (Southern Biotech) was added and the plates were incubated at room temperature for 1 h. After washing five times with PBS/0.5% Tween, the reaction was developed by using TMB (Interchim) and 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and the plates were read using BioTek ELx8000.

#### *Determination of IL-17 secretion after antigen stimulation*

Lung cells were prepared from lung homogenates by Percoll gradient centrifugation and resuspended in RPMI medium containing 10% fetal calf serum. Total splenocytes were isolated as described.<sup>13</sup> The cells were then stimulated for 72 h with 1 µg of PTX, FHA, or pertactin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The supernatants were then harvested and IL-17A was measured by ELISA using the mouse IL-17A ELISA Kit (Mabtech, Sweden). Isolation and flow cytometry analysis of cells from nasal tissue Ten minutes before euthanasia, mice were intravenously injected with 7.5 µg anti-CD45-PE antibody (ebiosciences) to allow for the distinction of circulating T cells (CD45-PE positive) and resident T cells (CD45-PE negative). Nasal tissue was scraped from the nasal cavity, digested with collagenase-D (1 mg/ml; Roche) and DNase I (10 mg/ml; Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C with agitation, and then passed through a cell strainer.

Cells were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) in the presence of brefeldin A (5 mg/ml) for 4 h at 37 °C. After incubation with LIVE/DEAD Aqua (Invitrogen), cells were surface stained with the following fluorochrome-conjugated antibodies: CD69-FITC, CD8-AF700, CD3-APC-ef780 (eBiosciences), CD44-BV605, CD4-BV785 (BioLegend), and CD103-PE-CF594 (BD Biosciences). For the detection of intracellular cytokines, cells were fixed and permeabilized using a FoxP3 Transcription Factor staining buffer set (ebiosciences), and stained with the following antibodies: IL-17-V450 (BD Biosciences) and IFN- $\gamma$ -PE-Cy7 (ebiosciences). Fluorescence minus one sample was used as control. Fluorescence-activated cell sorting samples were acquired on a LSR Fortessa using the BD Diva Software (BD Biosciences) and analyzed using the Flowjo Software (v10, TreeStar).

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test using the GraphPad Prism software. *P* values <0.05 were considered significant.

### Ethical statement

All the animal experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Ministry of Research regarding animal experiments, and the protocols were approved by the Ethical Committees of the Region Nord Pas de Calais and the Ministry of Research (agreement number APAFIS#9107±201603311654342 V3).

## ACKNOWLEDGEMENT

Part of this work has been financially supported by ILIAD Biotechnologies. K.H.G.M. is supported by Science Foundation Ireland (grant # 16/IA/4468).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.S., N.A., F.T., C.M. and C.L. designed the experiments; L.S., A.-S.D., A.T., L.C. and S.U. performed the experiments; L.B. and K.H.G.M. performed the Trm experiments, L.S., A.-S.D., N.A., C.M. and C.L. analyzed the data; L.S. and C.L. wrote the manuscript.

## ADDITIONAL INFORMATION

The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41385-018-0073-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Competing interest: A.-S.D., C.L. and L.S. are inventors of patents on the BPZE1 vaccine. The other authors declare no competing interests.

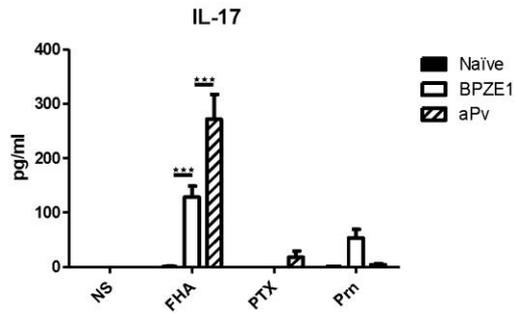
## REFERENCES

- Mattoo, S. & Cherry, J. D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 326–382 (2005).
- Hewlett, E. L. & Edwards, K. M. Clinical practice. Pertussis—not just for kids. *N. Engl. J. Med.* 352, 1215–1222 (2005).
- World Health Organization. Global routine vaccination coverage, 2010. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2011; 86:509–513.
- Cherry, J. D. Epidemic pertussis in 2012—the resurgence of a vaccine-preventable disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 785–787 (2012).
- Burns, D. L., Meade, B. D. & Messonnier, N. E. Pertussis resurgence: perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge. *J. Infect. Dis.* 209(Suppl. 1), S32–S35 (2014).
- Zhang, Q. et al. Prevalence of asymptomatic *Bordetella pertussis* and *Bordetella paraptussis* infections among school children in China as determined by pooled real-time PCR: a cross-sectional study. *Scand. J. Infect. Dis.* 46, 280–287 (2014).
- de Greeff, S. C. et al. Seroprevalence of pertussis in The Netherlands: evidence for increased circulation of *Bordetella pertussis*. *PLoS ONE* 5, e14183 (2010).
- Hodder, S. L. et al. Antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens and clinical correlations in elderly community residents. *Clin. Infect. Dis.* 31, 7–14 (2000).
- Moriuchi, T., Otsuka, N., Hiramatsu, Y., Shibayama, K. & Kamachi, K. A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: qualitative and quantitative analyses. *PLoS ONE* 12, e0181181 (2017).
- Scott, S. et al. Seroprevalence of pertussis in the Gambia: evidence for continued circulation of *Bordetella pertussis* despite high vaccination rates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 333–338 (2015).
- Althouse, B. M. & Scarpino, S. V. Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*. *BMC Med.* 13, 146 (2015).
- Warfel, J. M., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 787–792 (2014).

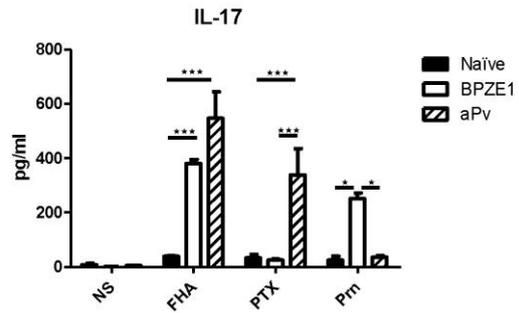
- Mielcarek, N. et al. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* 2, e65 (2006).
13. Locht, C. & Mielcarek, N. Live attenuated vaccines against pertussis. *Expert. Rev. Vaccin.* 13, 1147–1158 (2014).
  14. Thorstensson, R. et al. A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine—BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS ONE* 9, e83449 (2014).
  15. Locht, C. et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *B. pertussis* disease and infection. *J. Infect. Dis.* 216, 117–124 (2017).
  16. Guiso, N., Capiua, C., Carletti, G., Poolman, J. & Hauser, P. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 17, 2366–2376 (1999).
  17. Mills, K. H., Ryan, M., Ryan, E. & Mahon, B. P. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 66, 594–602 (1998).
  18. Mielcarek, N., Debrie, A.-S., Mahieux, S. & Locht, C. Dose response of attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1-induced protection in mice. *Clin. Vaccin. Immunol.* 17, 317–324 (2010).
  19. Higgs, R., Higgins, S. C., Ross, P. J. & Mills, K. H. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* 5, 485–500 (2012).
  20. Delacroix, D. L. et al. Changes in size, subclass, and metabolic properties of serum immunoglobulin A in liver diseases and in other diseases with high serum immunoglobulin A. *J. Clin. Invest.* 71, 358–367 (1983).
  21. Spencer, J. & Sollid, L. M. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunol.* 9, 1113–1124 (2016).
  22. Wilk, M. M. et al. Lung CD4 tissue-resident memory T cells mediate adaptive immunity induced by previous infection of mice with *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* 199, 233–243 (2017).
  23. Paddock, C. D. et al. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin. Infect. Dis.* 47, 328–338 (2008).
  24. Mills, K. H. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect.* 3, 655–677 (2001).
  25. Zackrisson, G., Lagergard, T., Trollfors, B. & Krantz, I. Immunoglobulin A antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in saliva from patients with pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1502–1505 (1990).
  26. Hellwig, S. M., van Spruiel, A. B., Schellekens, J. F., Mooi, F. R. & van de Winkel, J. G. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infect. Immun.* 69, 4846–4850 (2001).
  27. Wolfe, D. N., Kirimanjeswara, G. S., Goebel, E. M. & Harvill, E. T. Comparative role of immunoglobulin A in protective immunity against the *Bordetella* spp. *Infect. Immun.* 75, 4416–4422 (2007).
  28. Raeven, R. H. et al. Molecular and cellular signatures underlying superior immunity against *Bordetella pertussis* upon pulmonary vaccination. *Mucosal Immunol.* 11, 979–993 (2018).
  29. Raeven, R. H. et al. Immunological signatures after *Bordetella pertussis* infection demonstrates importance of pulmonary innate immune cells. *PLoS ONE* 11, e0164027 (2016).
  30. Ross, P. J. et al. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog.* 9, e1003264 (2013).
  31. Misiak, A., Wilk, M. M., Raverdeau, M. & Mills, K. H. IL-17-producing innate and pathogen-specific tissue resident memory gammadelta T cells expand in the lungs of *Bordetella pertussis*-infected mice. *J. Immunol.* 198, 363–374 (2017).
  32. Locht, C. Live pertussis vaccines: will they protect against carriage and spread of pertussis? *Clin. Microbiol. Infect.* 22(Suppl. 5), S96–S102 (2016).
  33. Healy, C. M., Rench, M. A., Wootton, S. H. & Castagnini, L. A. Evaluation of the impact of a pertussis cocooning program on infant pertussis infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 22–26 (2015).
  34. Feunou, P. F., Bertout, J. & Locht, C. T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against para-pertussis. *PLoS ONE* 5, e10178 (2010).
  35. Witt, M. A., Katz, P. H. & Witt, D. J. Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak. *Clin. Infect. Dis.* 54, 1730–1735 (2012).
  36. Feunou, P. F., Kammoun, H., Debrie, A. S., Mielcarek, N. & Locht, C. Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated *B. pertussis* BPZE1. *Vaccine* 28, 7047–7053 (2010).
  37. Christensen, D., Mortensen, R., Rosenkrands, I., Dietrich, J. & Andersen, P. Vaccine-induced Th17 cells are established as resident memory cells in the lung and promote local IgA responses. *Mucosal Immunol.* 10, 260–270 (2017).
  38. Jaffar, Z., Ferrini, M. E., Herritt, L. A. & Roberts, K. Cutting edge: lung mucosal Th17-mediated responses induce polymeric Ig receptor expression by the airway epithelium and elevate secretory IgA levels. *J. Immunol.* 182, 4507–4511 (2009).
  39. Mosley, Y. C., Lu, F. & Hogenesch, H. Differences in innate IFN $\gamma$  and IL-17 responses to *Bordetella pertussis* between BALB/c and C57BL/6 mice: role of gammadelta T cells, NK cells, and dendritic cells. *Immunol. Res.* 65, 1139–1149 (2017).
  40. Warfel, J. M. & Merkel, T. J. *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* 6, 787–796 (2013).
  41. Fedele, G., Bianco, M., Debrie, A. S., Locht, C. & Ausiello, C. M. Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine candidate BPZE1 promotes human dendritic cell CCL21-induced migration and drives a Th1/Th17 response. *J. Immunol.* 186, 5388–5396 (2011).
  42. Schiavoni, I. et al. Live attenuated *B. pertussis* BPZE1 rescues the immune functions of respiratory syncytial virus infected human dendritic cells by promoting Th1/Th17 responses. *PLoS ONE* 9, e100166 (2014).
  43. Menozzi, F. D. et al. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 62, 769–778 (1994).
  44. Antoine, R. et al. The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J. Mol. Biol.* 351, 799–809 (2005).
  45. Harriman, G. R. et al. Targeted deletion of the IgA constant region in mice leads to IgA deficiency with alterations in expression of other Ig isotypes. *J. Immunol.* 162, 2521–2529 (1999).
  46. Mbawuike, I. N. et al. Mucosal immunity to influenza without IgA: an IgA knockout mouse model. *J. Immunol.* 162, 2530–2537 (1999).
  47. Johansen, F. E. et al. Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. *J. Exp. Med.* 190, 915–922 (1999).

Supplementary Figure 1

A: Spleens

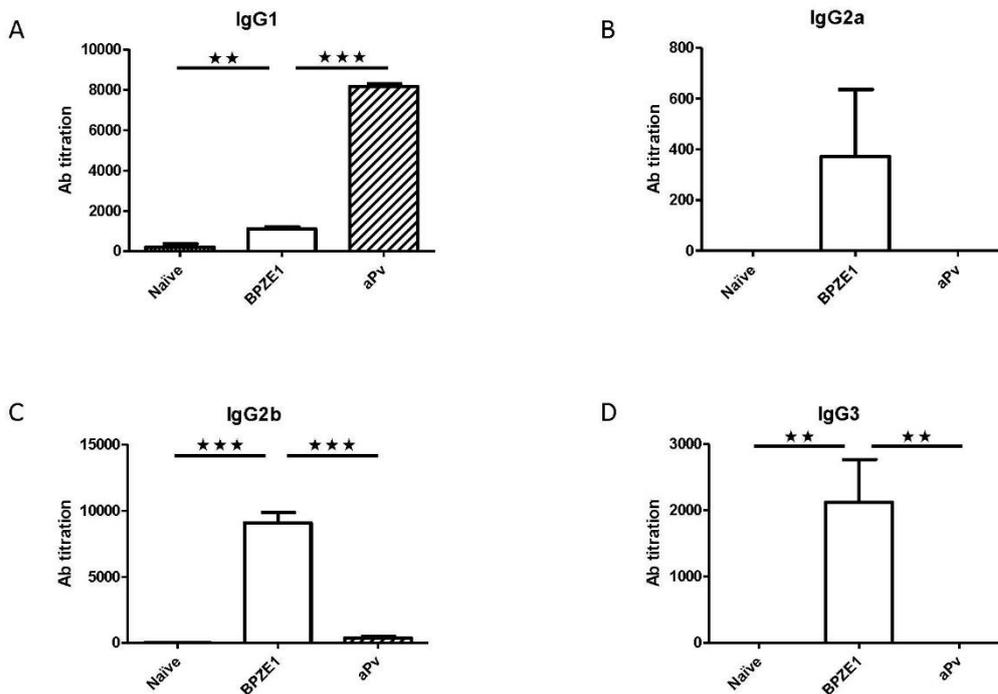


B: Lungs



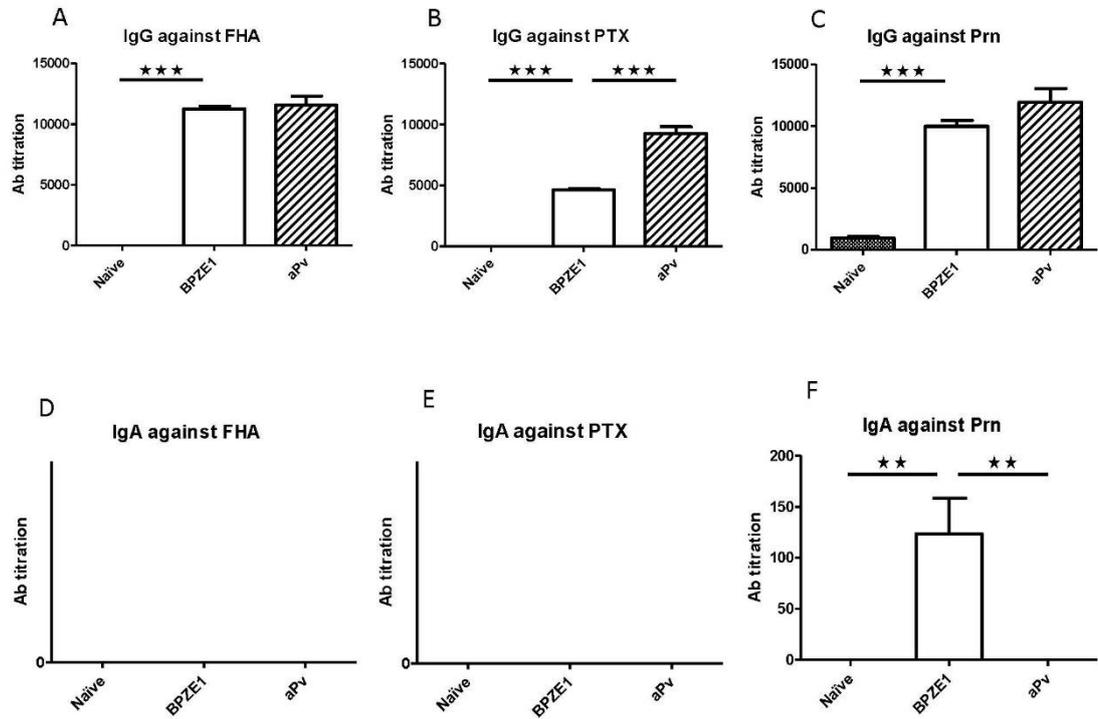
**Supplementary Figure 1. IL-17 production in spleens and lungs after stimulation with *B. pertussis* antigens.** Splenocytes (A) and lung cells (B) from naïve mice or mice vaccinated once with BPZE1 or twice with aPv as indicated were stimulated with FHA, PTX or pertactin (Prn) for 72 h and IL-17 concentrations were measured in the supernatants. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Supplementary Figure 2



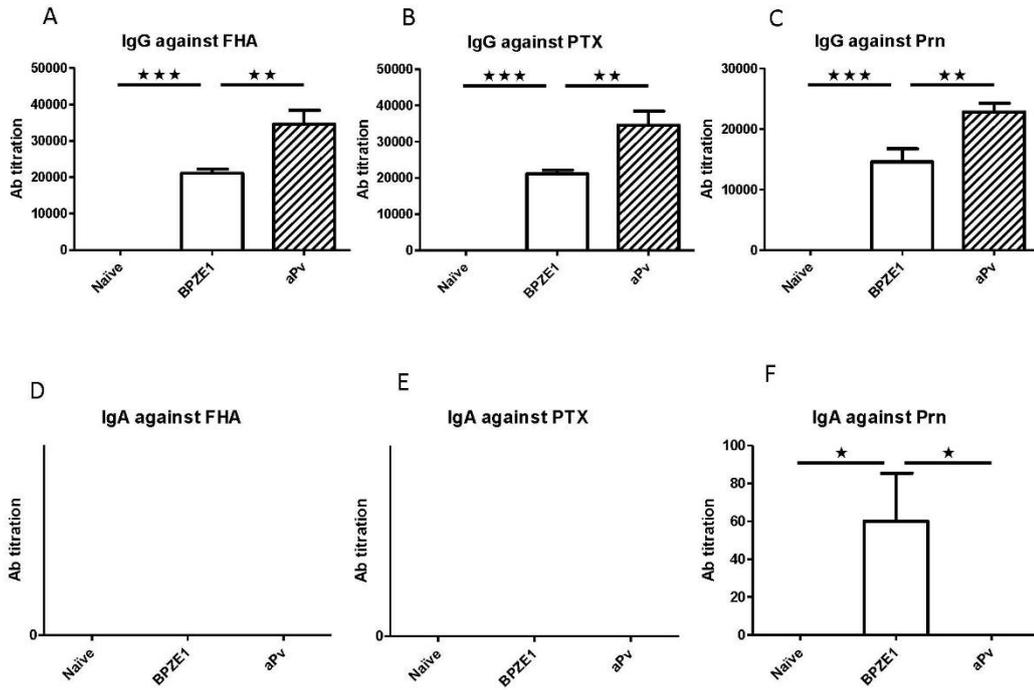
**Supplementary Figure 2. Serum IgG isotype induced by BPZE1 or aPv in C57BL/6 mice.** C57BL/6 mice were vaccinated once with BPZE1, twice with aPv or were left unvaccinated (Naïve) as indicated. Eight weeks after the first vaccination mice were sacrificed and serum was collected. Total IgG1 (A), IgG2a (B), IgG2b (C) and IgG3 (D) titers were measured against BPSM lysate protein extract. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  by 1-way ANOVA and *Bonferroni* post-hoc test.

Supplementary Figure 3



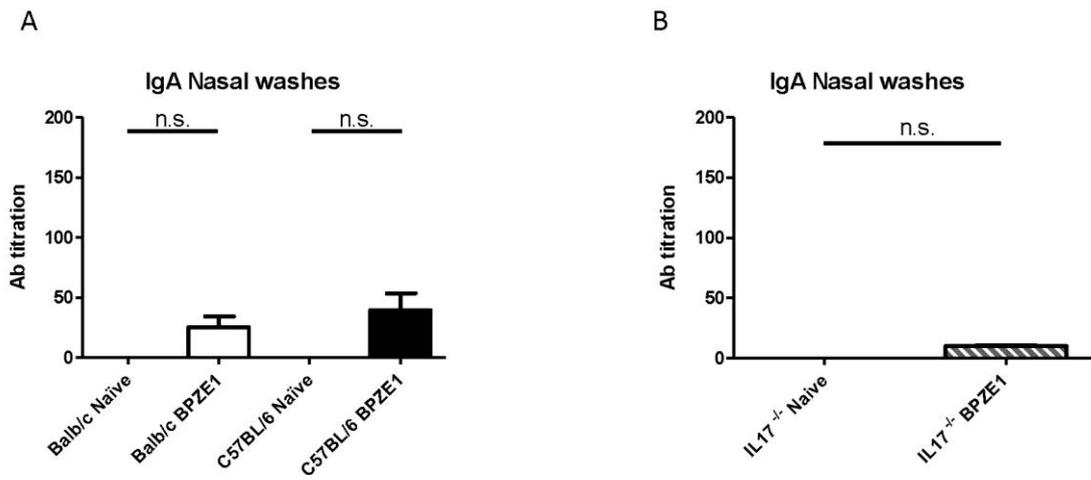
**Supplementary Figure 3. FHA-, PTX-, and pertactin-specific serum IgG and IgA induced by BPZE1 or aPV in Balb/c mice.** Balb/c mice were vaccinated once with BPZE1, twice with aPV or were left unvaccinated (Naïve) as indicated. Eight weeks after the first vaccination mice were sacrificed and serum was collected. IgG1 (A-C) and IgA (D-F) titers were measured against FHA (AF). \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  by 1-way ANOVA and *Bonferroni* post-hoc test.

Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4. FHA-, PTX-, and pertactin-specific serum IgG and IgA induced by BPZE1 or aPV in C57BL/6 mice.** C57BL/6 mice were vaccinated once with BPZE1, twice with aPV or were left unvaccinated (Naïve) as indicated. Eight weeks after the first vaccination mice were sacrificed and serum was collected. IgG1 (A-C) and IgA (D-F) titers were measured against FHA (AF). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  by 1-way ANOVA and *Bonferroni* post-hoc test.

Supplementary Figure 5



**Supplementary Figure 5. IgA titers in nasal washes 10 months after BPZE1 vaccination or in *IL-17*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Balb/c and C57BL/6 mice were vaccinated once with BPZE1 or left unvaccinated (Naïve) as indicated. Ten months later, IgA titers against total *B. pertussis* cell lysate were measured in the nasal washes. (B) *IL-17*<sup>-/-</sup> mice were vaccinated once with BPZE1 or left unvaccinated (Naïve) as indicated. Eight weeks later, IgA titers against total *B. pertussis* cell lysate were measured in the nasal washes. n.s., not significant.

*La coqueluche est une maladie respiratoire causée par la bactérie Bordetella pertussis. Cette maladie peut être particulièrement grave, voire mortelle, chez les nouveau-nés encore trop jeunes pour être pleinement vaccinés et protégés, mais elle peut également être sévère chez les adultes. Malgré une forte couverture vaccinale mondiale, on constate une résurgence globale de la maladie et un changement épidémiologique dans la population des pays à revenus élevés. Une réflexion approfondie sur les mécanismes immunitaires induits lors d'une infection à B. pertussis ou d'une vaccination pour identifier des biomarqueurs de protection afin d'améliorer l'efficacité des vaccins actuels est donc nécessaire. A ce jour, aucun corrélât de protection n'a été identifié et la caractérisation de la réponse anticorps semble essentielle pour identifier des marqueurs protecteurs. L'étude présentée dans ce manuscrit vise à définir l'immunité humorale systémique et mucosale induite lors d'une infection ou d'une vaccination à B. pertussis en analysant la fonctionnalité des anticorps à travers la réponse monoclonale et polyclonale dans divers modèles d'études.*

*Le développement d'un test in vitro à haut-débit, le Bordetella Growth Inhibition Assay (BGIA), dans l'objectif d'évaluer rapidement l'inhibition de croissance de B. pertussis par bioluminescence a permis de caractériser les effets bactériostatiques et bactériolytiques anticorps-dépendants de divers sérums en fonction de la présence de complément. Ce test a été appliqué à l'étude d'anticorps monoclonaux (mAbs) dirigés contre des antigènes majeurs présents dans les vaccins acellulaires et a montré un rôle potentiel des anticorps anti-hémagglutinine filamenteuse dans l'inhibition de croissance de la bactérie. L'étude des propriétés structurales et fonctionnelles en termes d'affinité et de force de liaison de ces mAbs, montre que celles-ci sont très variables, malgré une reconnaissance du même épitope.*

*La caractérisation de la réponse anticorps suite à une infection à B. pertussis ou une vaccination par un vaccin vivant (BPZE1) a été réalisée en modèle babouin par BGIA. Le vaccin BPZE1 induit chez le babouin la production d'anticorps inhibiteurs de croissance qui est amplifiée de façon dose-dépendante après infection et dont l'activité semble être similaire à celle des anticorps induits lors d'une infection naturelle. Cette activité perdure pendant au moins 4 semaines et pouvait être corrélée à la présence d'anticorps anti-pertactine (PRN).*

*L'interférence de la vaccination maternelle sur la mise en place de la réponse humorale de l'enfant a été évaluée en BGIA sur une cohorte d'enfants Thaïlandais immunisés avec un vaccin acellulaire (aP) ou cellulaire (wP) comparé aux enfants contrôles vaccinés wP, nés de mères non-revaccinées. Nous avons montré que la vaccination maternelle interfère avec la production d'anticorps chez les enfants vaccinés wP après la vaccination et le rappel, comparé au groupe aP. Cette interférence perdure au-delà du rappel des enfants vaccinés wP, comparé au groupe contrôle. Suite à la vaccination maternelle, l'activité inhibitrice des anticorps, indépendamment du complément, est améliorée après la dose de rappel wP comparativement à un rappel aP. A long terme la vaccination wP, chez les enfants nés de mères revaccinées ou non, induit une réponse anticorps plus inhibitrice que la vaccination aP. L'activité inhibitrice des sérums issus des enfants vaccinés wP et de mères revaccinées a été corrélée avec la présence d'anticorps anti-PRN.*

*Le modèle murin a permis de mettre en évidence l'importance des anticorps sériques dans la clairance pulmonaire, mais pas dans la clairance nasale. De plus, une prolongation de la colonisation bactérienne 2 mois après une infection de souris immunisées avec le vaccin aP dans la muqueuse nasale a été démontrée. Cette persistance est limitée au modèle souris BALB/c et ne dépend ni de la dose d'infection, ni de l'âge, ni du sexe des souris. Néanmoins, nous avons montré d'une part, que la protection nasale était dépendante d'IL17 et d'autre part, que la clairance nasale des souris vaccinées aP dépendait de l'expression du récepteur d'immunoglobuline polymérique (PIGR). La cytokine IL17 et le récepteur PIGR sont nécessaires à la sécrétion des IgA et à l'immunité mucosale.*

*Nous avons documenté les effets inhibiteurs des anticorps ainsi que les mécanismes in vitro et in vivo qui sous-tendent cette activité antimicrobienne. Cette étude a permis de clarifier l'importance fonctionnelle de la réponse immunitaire humorale systémique et mucosale dans la protection contre la bactérie.*