

DEMANDE DE RENOUVELLEMENT DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE POUR LES CORYNEBACTERIES DU COMPLEXE DIPHThERIAE

2012-2016

**UNITE de Recherche Prévention et Thérapies Moléculaires des Maladies Humaines
Institut Pasteur**



Responsable : Nicole GUISO

Adjoint : Edgar BADELL-OCANDO

Sommaire

A	FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE	5
B	NOTE DE PRESENTATION ET DE MOTIVATION	7
B.1	COURRIER OFFICIEL D'ACTE DE CANDIDATURE (INDIQUANT AGENT PATHOGENE OU THEMATIQUE CONCERNE)	7
B.2	POURQUOI FAUT-IL UN CNR DES CORYNEBACTERIES DU COMPLEXE <i>DIPHtherIAE</i>?	8
C	DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE	11
C.1	ORGANISATION PROPOSEE POUR REpondRE AUX EXIGENCES FIXEES DANS LE CAHIER DES CHARGES	11
C.2	LES MOYENS dont DISPOSE LE LABORATOIRE QUI SERAIENT AFFECTES AU CNR	11
C2.1	EN MATIERE DE RESSOURCES HUMAINES	11
C2.2	EN MATIERE D'EQUIPEMENTS ET DE LOGISTIQUE	15
C.3	BREF DESCRIPTIF DES THEMATIQUES DE RECHERCHE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR	16
C.4	CAPACITES TECHNIQUES ACTUELLES DU LABORATOIRE DANS LE DOMAINE SPECIFIQUE DU CNR	16
C4.1	LISTE DES TECHNIQUES POUR LE DIAGNOSTIC/IDENTIFICATION, TYPAGE EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTI-INFECTIEUX	16
C4.2	COLLECTIONS DE SOUCHES, ANTIGENES OU IMMUN-SERUMS DE REFERENCE DISPONIBLES	17
D	BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2006-2010)	20
D.1	LES ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE	20
D1.1	NATURE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES ETUDIES	20
D1.2	NOMBRE DE PRELEVEMENTS ET D'ISOLATS CLINIQUES REÇUS ENTRE 2006 ET 2010	20
D1.3	ANTIBIO-RESISTANCE DES ISOLATS DU COMPLEXE <i>DIPHtherIAE</i> COLLECTES ENTRE 2008 ET 2010	22
D1.4	DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE MOLECULAIRE D'IDENTIFICATION DES TROIS ESPECES DU COMPLEXE <i>DIPHtherIAE</i>	23
D1.5	PARTICIPATION AUX CONTROLES QUALITE	23
D.2	RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE	23
D2.1	DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE TYPAGE DES <i>C. DIPHTHERIAE</i>	23
D2.2	COLLABORATION AVEC LE BRESIL	26
D2.3	QUELLE EST L'IMMUNITE DE LA POPULATION ADULTE VACCINEE SELON LES RECOMMANDATIONS FRANÇAISES CONTRE LE TETANOS, LA DIPHTERIE ET LA COQUELUCHE ?	26
D.3	LA CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE OU A L'ALERTE	27
D3.1	EUROPE	27
D3.2	INTERNATIONAL	27
D3.3	ALERTE	27
D.4	CONSEIL AUX PROFESSIONNELS OU AUX AUTORITES DE SANTE	28

E	<u>LISTE DES PUBLICATIONS</u>	30
E.1	PUBLICATIONS NATIONALES	30
E.2	PUBLICATIONS INTERNATIONALES	30
E.3	COMMUNICATIONS NATIONALES	30
E.4	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES (TOUTES SUR INVITATION)	30
E.5	ENSEIGNEMENTS DE JANVIER 2006 A DECEMBRE 2010	31
E.6	EXPERTISES	31
F	<u>DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU CNR</u>	33
G	<u>DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE</u>	36
H	<u>PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2012-2016</u>	40
H.1	PROJETS DU CNR	40
H1.1	CONSTITUTION D'UNE COLLECTION	40
H1.2	DEVELOPPEMENT DE LA PCR EN TEMPS REEL POUR DETECTER LE GENE DE <i>TOX</i> DIRECTEMENT DANS LES PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES	40
H1.3	ANALYSE TEMPORELLE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES	40
H1.4	DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-TOXINE DIPHTERIQUE	40
H.2	PROJETS DE L'UNITE DE RECHERCHE EN RELATION AVEC LE CNR	41
H2.1	POURSUITE DE LA COMPARAISON DE LA TECHNIQUE DE RIBOTYPIE AVEC LA TECHNIQUE DE MLST	41
H2.2	DEVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE DE TYPAGE MLST POUR LES ESPECES <i>C. ULCERANS</i> ET <i>C. PSEUDOTUBERCULOSIS</i>	41
H2.3	ANALYSE TEMPORELLE DES ISOLATS DE <i>C. DIPHTHERIAE</i> ET <i>C. ULCERANS</i> EN FRANCE	42
H2.4	SEQUENÇAGE DU GENE CODANT LA TOXINE DIPHTERIQUE	42
H2.5	ANALYSE DES ISOLATS PORTEURS DU GENE <i>TOX</i> MAIS N'EXPRIMANT PAS LA TOXINE	42
H2.6	ANALYSE DU GENE <i>DTX R</i> DES ISOLATS NE PORTANT PAS LE GENE <i>TOX</i>	42
ANNEXE 1	<u>CLASS 1 INTEGRON AND RESISTANCE TO TRIMETHOPRIME-SULFAMETHOXAZOLE IN A TOXIGENIC CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE MITIS</u>	43

FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE

A FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE

L'unité de recherche Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines

Institut Pasteur
25 rue du Dr ROUX
75724 PARIS Cedex 15

Représentée par **Nicole GUISO** en tant que responsable scientifique

Téléphone : +33 (0)1 45 68 83 34 – Fax : +33 (0)1 40 61 35 33 – e-mail :
nicole.guiso@pasteur.fr

Secondée par **Edgar BADELL-OCANDO** en tant qu'adjoint

Téléphone : +33 (0)1 44 38 94 40 - Fax : +33 (0)1 40 61 35 33 – email : edgar.badell-ocando@pasteur.fr

Représentée par **Christophe MAURIET** en tant que responsable administratif

Téléphone : +33 (0)1 45 68 80 10 – e-mail : christophe.mauriet@pasteur.fr

NOTE DE PRESENTATION ET DE MOTIVATION

B NOTE DE PRESENTATION ET DE MOTIVATION

B.1 Courrier officiel d'acte de candidature (indiquant Agent pathogène ou thématique concerné)

Nous avons repris le Centre National de Référence (CNR) "des corynebactéries toxigènes" depuis seulement 2008. Depuis nous avons intégré les thèmes de recherche de ce CNR dans celles effectuées dans le cadre de l'Unité de « Prévention et Thérapies Moléculaires des Maladies Humaines » (PTMMH) de l'Institut Pasteur. Cette unité poursuit des recherches sur les conséquences de la vaccination intensive sur les micro-organismes ciblés par la vaccination, les populations humaines vaccinées et le développement d'outils thérapeutiques lorsque la prévention n'est pas possible.

Nous avons repris cette activité de surveillance car elle s'intègre bien dans nos activités de recherche mais aussi afin d'améliorer les diagnostics biologiques de la maladie, base de la surveillance, et surtout analyser l'impact de la vaccination généralisée sur l'éventuelle modification du germe ciblé par le vaccin sous-unitaire utilisé depuis des décennies.

La vaccinologie est une vraie science qui est évolutive, nous le savons maintenant, puisque nous avons 70 ans de recul par rapport à l'introduction généralisée de certains vaccins. Science évolutive en fonction des types de vaccins utilisés (tués, atténués vivants, sous-unitaires.....), des calendriers vaccinaux, des connaissances des populations humaines, du vieillissement de ces populations, de leur environnement, en particulier microbien, et de leur mode de vie.

Il est maintenant bien démontré que toute introduction d'un vaccin dans une population, indépendamment de son impact très positif sur l'élimination ou le contrôle des maladies infectieuses, nécessite une surveillance épidémiologique et microbiologique continue.

Pourquoi notre unité veut-elle continuer, en parallèle de ses recherches, à s'engager dans la surveillance de deux maladies à prévention vaccinale, la diphtérie et la coqueluche, que les populations de certains pays développés considèrent comme contrôlées ?

- car les vaccins ciblant ces bactéries sont les plus anciens ;
- car selon les types de vaccins, soit à germes entiers soit sous-unitaires, l'immunité induite est différente ;
- car, dans le cas de la coqueluche, la stratégie vaccinale a permis la diminution de la mortalité et de la morbidité chez les jeunes enfants mais a modifié les caractéristiques

de la maladie et en particulier sa transmission qui est maintenant d'adultes à nouveau-nés et non d'enfants à enfants ;

- car l'utilisation des trois types de vaccins a modifié l'écologie bactérienne et qu'il est donc important de surveiller maintenant l'émergence d'espèces nouvelles non ciblées par les vaccins ;
- car ces maladies peuvent être considérées comme des zoonoses ;
- car la population humaine des pays développés vieillit et par conséquent devient de plus en plus susceptible à ces maladies ou à de nouvelles.

B.2 Pourquoi faut-il un CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*?

Préambule : l'appel d'offre concerne un CNR des corynebactéries en général dans son titre, mais essentiellement les trois espèces du complexe *diphtheriae* dans son cahier des charges. Le problème de santé publique concerne ces trois espèces et non l'ensemble du genre corynebactéries (ce qui ne serait absolument pas possible avec les moyens alloués). Nous proposons donc le nom de Corynebactéries du complexe *diphtheriae* ou alors diphtérie.

Les espèces bactériennes du complexe *diphtheriae* sont au nombre de trois : *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* et *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pourquoi complexe ? Tout simplement car ce sont les trois espèces du genre *Corynebacterium* capables d'héberger un phage porteur dans son matériel génétique du gène *tox* codant la toxine diphtérique, ces trois espèces sont donc des agents de la diphtérie.

Qu'en est-il de la nécessité d'un CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae* ?

La diphtérie, due à *C. diphtheriae*, est une maladie à prévention vaccinale depuis 1930. Le calendrier français consiste en une primo vaccination à 2, 3, 4 mois avec un rappel à 16-18 mois puis des rappels tous les cinq ans jusqu'à 18 ans. Depuis 2005 un rappel tous les dix ans a été introduit chez les adultes. La couverture vaccinale élevée surtout chez les enfants (98%) a permis un contrôle de la maladie (45 000 cas à la fin des années 40 à quelques cas dans les années 80) et le dernier cas autochtone datait de 1989 (deux cas autochtones ont été déclarés en 2011).

Plusieurs raisons font que le renouvellement de ce CNR nous semble important :

1. **les cas d'importation** : après plus de 10 ans sans aucun cas notifié, quatre cas d'infection à *C. diphtheriae* ont été rapportés entre 2002 et 2010. Tous sont des cas importés. Aucun cas n'est

décédé. *Cependant, ces cas d'importation indiquent une baisse de la couverture chez les adultes en France et donc une surveillance de cette population ;*

2. **l'émergence de cas autochtones** : depuis 2000 des cas de diphtérie liés à *C. ulcerans*, par transmission zoonotique, au Royaume Uni et en France a justifié en Europe l'extension de la déclaration obligatoire aux infections dues à *C. ulcerans*. *Cette émergence de nouveaux cas justifie la surveillance de cette espèce bactérienne en parallèle à la surveillance de C. diphtheriae ;*

3. **l'identification des espèces du complexe diphtheriae** : la surveillance de ces trois espèces bactériennes nécessite des techniques d'identification et d'analyse des trois espèces bactériennes fiables ce qui n'est pas toujours le cas, les techniques n'ayant pas été modernisées en raison du faible nombre de cas. *Le développement de techniques moléculaires d'identification est donc nécessaire ;*

4. **l'évolution de l'antibiorésistance ces dernières années** : l'analyse de la sensibilité (méthodes des disques) des bactéries isolées entre 2008 et 2010 a montré que près de 90 % des isolats sont à sensibilité diminuée ou résistantes à la pénicilline G et près de la moitié intermédiaires aux céphalosporines de 3^{ème} génération. *L'analyse temporelle de l'antibiorésistance doit être entreprise afin d'analyser son évolution ;*

5. **l'évolution temporelle des isolats et leur comparaison avec ceux circulant dans des zones d'endémie** : à cette fin des techniques de génotypage et de typage doivent maintenant être développées afin de pouvoir être facilement échangées entre pays. *L'analyse temporelle du génome des isolats et surtout du gène codant la toxine est nécessaire pour suivre l'évolution des espèces sous pression vaccinale.*

DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE

C DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE

C.1 Organisation proposée pour répondre aux exigences fixées dans le cahier des charges

L'unité de recherche PTMMH assurera seule, les exigences prévues au cahier des charges.

C.2 Les moyens dont dispose le laboratoire qui seraient affectés au CNR

C2.1 En matière de ressources humaines

- CURRICULUM VITAE

Nicole GUISO
13 mars 1951

Nationalité française
Veuve, 3 enfants

Formation Universitaire

Docteur ès sciences, 1980
Docteur de Troisième cycle, 1976
Certificat d'Immunologie Approfondie, Institut Pasteur 1973
Diplôme d'études approfondies (Immunologie) 1973
Maîtrise ès sciences (Biochimie) 1972
Licence ès sciences (Biochimie) 1971

Expérience professionnelle

Depuis 2008 : Directrice du "Centre National de Référence des Corynebactérires toxigènes"
Institut Pasteur
Depuis 2004 : Chef de l'unité "Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines", Institut Pasteur
Depuis 2002-2006 : Directeur du Département "Ecosystèmes et Epidémiologie des Maladies Infectieuses", Institut Pasteur
2000-2003 Chef de l'Unité des *Bordetella*, Institut Pasteur
Depuis 1993 : Directrice du "Centre National de Référence de la coqueluche et autres bordetelloses », Institut Pasteur
De 1995 à 1999 : Responsable du "Laboratoire des *Bordetella*", Institut Pasteur
Depuis 1991 : Chef de laboratoire Institut Pasteur
1988-1991 : Chargée de Recherche Institut Pasteur
1986-1987 : "Visiting scientist" : National Jewish Hospital, Denver, Colorado, U.S.A.
1982-1985 : Chargée de Recherche Institut Pasteur
1977-1981 : Assistante Institut Pasteur
1975-1976 : Boursière de la "Fondation Roux", Institut Pasteur
1972-1974 : Stagiaire bénévole, Institut Pasteur

Autres activités

Colloques-Séminaires	Participation à nombreux colloques et séminaires, français et internationaux
Enseignements	Un nombre important de cours donnés à l'Institut Pasteur, en France et à l'étranger
Direction de recherches	9 thèses (5-6 ans), 10 post-docs, 34 stagiaires (3-7 mois)
Comités scientifiques	Invitée à titre d'expert sur la coqueluche par différents organismes en France et à l'étranger Comité Technique des Vaccinations, InVS, AFSSA, Instituts supérieurs de santé dans différents pays, OMS...) Membre Elu de l'Assemblée des Cents (1996- ...) Membre de la Commission Centrale d'animalerie de l'Institut Pasteur (1990-) Présidente du Comité des Nouveaux Programmes concernant le Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts Associés : CNPRI (2000-2001) Coordinatrice du groupe de prospectives "Epidémiologie –Santé Publique" (2000) Membre du Comité scientifique du Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts Associés (1998-1999) Membre de la Commission de Classement de l'Institut Pasteur à Paris (1982-1986 ; 1993-1996) Membre des Jury de Qualification de l'Institut Pasteur à Paris (1982-1986 ; 1988-1992 ; 1994-1997) Membre du Conseil scientifique de l'Institut Pasteur à Paris (1999-2002)

Distinctions

Grade de Chevalier de la Légion d'Honneur 2006
Grade de Chevalier dans l'Ordre National du Mérite 2001.
(Académie de Médecine) 1998
Lauréate du "Prix du Docteur Darolles"
Prix de la Société Française de Chimie) 1984
Lauréate du "Prix Nicloux"

Sociétés Savantes

Membre : Société Française de Microbiologie et American Society for Microbiology
Membre : European Society for Paediatric Infectious Diseases et European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Publications

138 publications et 106 revues avec comité de lecture

Edgar BADELL-OCANDO
Né le 08 Septembre 1958
Célibataire

Nationalité vénézuélienne
Résident français

Formation Universitaire

1997 - Docteur d'université, en Microbiologie. UFR de Biochimie. Université Paris VII. Sujet de thèse : "Mise au point d'un modèle murin pour l'étude du paludisme humain à *Plasmodium falciparum*". Directeur de thèse : Dr. P. Druilhe (Institut Pasteur).

1991 - Equivalence du DEA. Faculté de Sciences de l'Université Paris VII. UFR de Biochimie.

1988 - Licence de Biologie. Faculté de Sciences de l'Université Centrale du Venezuela. (Caracas, Venezuela). Sujet de Thèse: "Evaluation de la capacité phagocytaire des leucocytes neutrophiles humains vis-à-vis des promastigotes de *Leishmania spp*"

Formation professionnelle

2004 Expérimentation Animale. Niveau I. Institut Pasteur, Paris.
Autorisation numéro 75-924 du 30 juin 2004

1998 "Cours d'Immunologie Générale". Institut Pasteur, Paris

1995 "Polynucléaires Neutrophiles et Biologie Clinique". Hôpital Rothschild, Paris

1987 "2ème Symposium latino-américain sur les Leishmanioses". Université Centre-Occidentale Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela ; "Immunologie des maladies parasitaires". Université Centrale du Venezuela. Caracas, Venezuela.

1986 "2ème Symposium latino-américain d'Immunologie Clinique". Centre Médico-Docente La Trinidad. Caracas, Venezuela

1985 "Manipulation du système immunitaire. Immunomodulation". Colégio Médico del Dto Fédéral, Caracas, Venezuela

1984 "Cycle Educatif sur la maladie de Chagas". Université Centrale du Venezuela. Caracas, Venezuela ; "Actualisation : Immunologie 84". Hôpital José Maria Vargas. Caracas, Venezuela.

1983 "Progrès récents en Immunologie". Colégio Médico del Dto Federal, Caracas, Venezuela ; "Symposium National d'Allergie et Immunologie". Centre Médico-Docente La Trinidad. Caracas, Venezuela

Expérience professionnelle

2009- **Ingénieur de recherche. Responsable adjoint du Centre National de Référence des Corynebactéries toxigènes**, dans l'Unité de Prévention et Thérapie Moléculaire des Maladies humaines, Institut Pasteur, Paris

2002-2009 **Ingénieur de recherche**, dans l'Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur, Paris.

2000-2002 **Chercheur contractuel**, dans l'Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur, Paris.

1999-2000 **Chercheur contractuel**, dans l'Unité de Parasitologie Biomédicale, Institut Pasteur, Paris.

1998-1999 **Stage post-doctoral**, dans le laboratoire de Parasitologie Biomédicale, Institut Pasteur, Paris.

1995-1997 **Boursier C.I.E.S** dans le laboratoire de Parasitologie Biomédicale, Institut Pasteur, Paris.

1991-1995 **Boursier du Gouvernement vénézuélien**, dans le laboratoire de Parasitologie Biomédicale, Institut Pasteur, Paris.

1988-1991 Chercheur assistant dans le laboratoire d'Immunopathologie, Institut de Biomédecine, Caracas, Venezuela.

1982-1988 Technicien du laboratoire dans le laboratoire d'Immunopathologie, Institut de Biomédecine, Caracas, Venezuela.

Autres activités

Colloques-Séminaires : Participation à quelques colloques et séminaires, français et internationaux
Direction de recherches 3 stagiaires (1 mois)

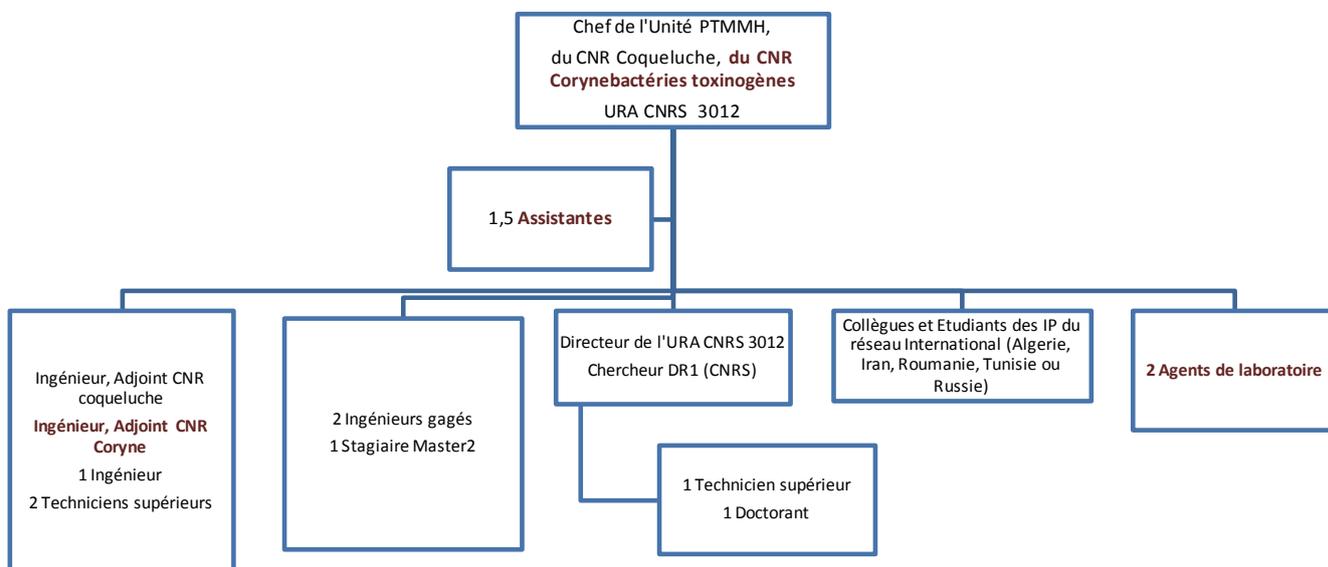
Publications

23 publications avec comité de lecture

- **Etat des emplois rémunérés**

- d'un chef d'unité, **Nicole Guiso responsable du CNR (CV ci-dessus)** ; (0.10 ETP)
- responsable adjoint du CNR **Edgar Badell-Ocando** (0.50 ETP)
- technicien supérieur de laboratoire à recruter (0.50 ETP) Demi poste de technicien supérieur qui ne fait que régulariser cette demande de renouvellement, impliqué par le surcroît des activités réalisées par le CNR.
- secrétariat **Sophie Veillault** (0.15 ETP)
- Laboratoire de préparation **Mélanie Denizon** (0.10 ETP)

- **Organigramme de l'unité**

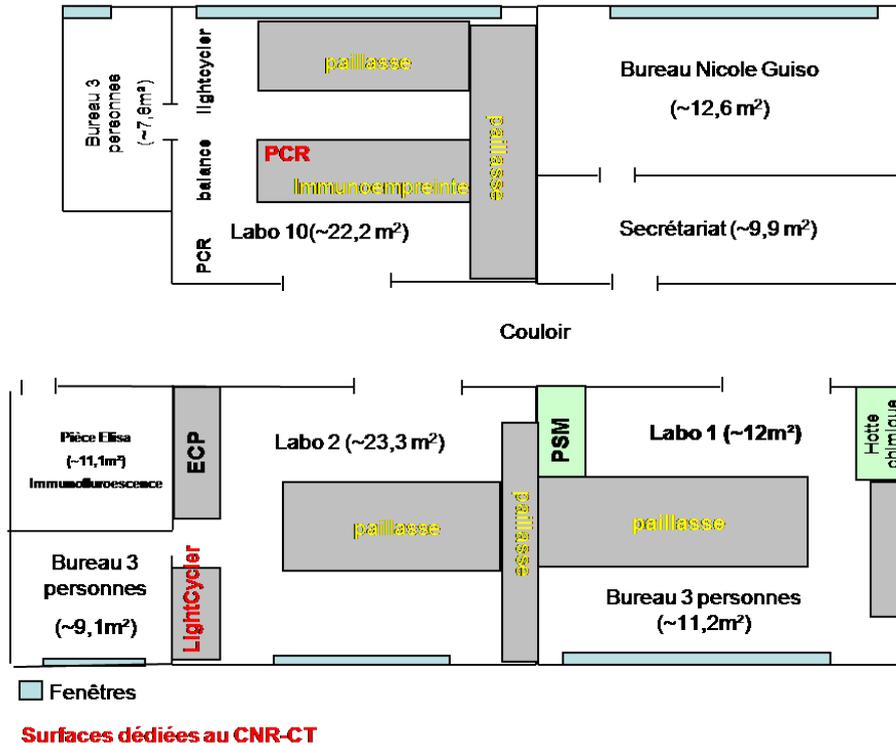


C2.2 En matière d'équipements et de logistique

- Plan et surface des locaux de l'unité de recherche Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines

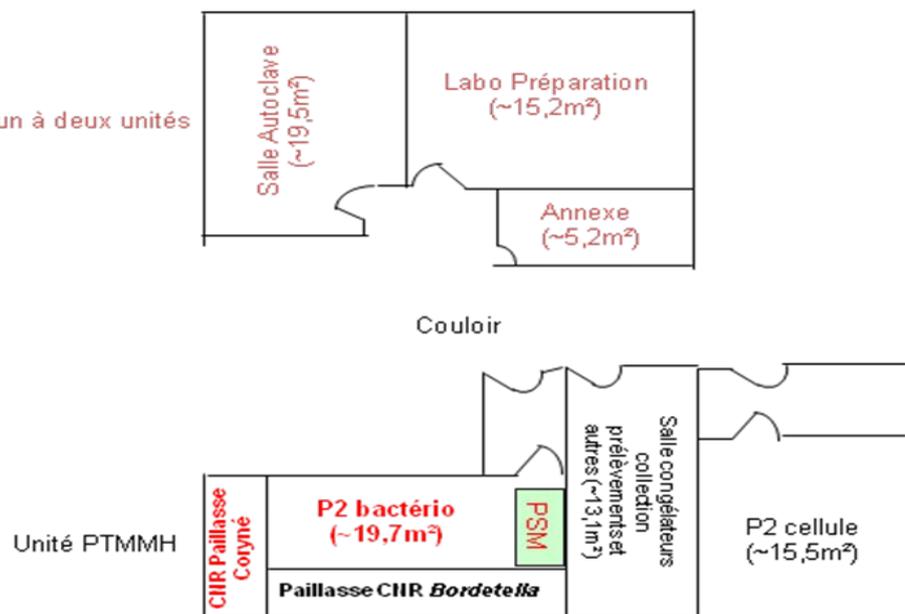
RdC Bât Roux

Unité PTMMH



Sous Sol
Bât Roux
Unité PTMMH/unité UAA

Commun à deux unités



Nous tenons à vous informer qu'au cours du mandat 2012-2016, des changements de locaux sont prévus. Aussi nous nous engageons à vous faire parvenir les plans des nouveaux locaux dès que ceux-ci seront définis.

- **Principaux équipements**

- 2 appareils à Champs pulsés
- 1 Chaîne ELISA
- 1 Appareil PCR Lightcycler Roche en commun avec 4 CNR et la CIBU
- 1 extracteur d'acide nucléique
- 2 postes de sécurité microbiologiques
- 5 Centrifugeuses
- 6 étuves
- Compteur à radioactivité
- 1 Microscopie à fluorescence
- 3 Congélateurs -80° et plusieurs -20°C
- 2 bains agitant pour culture

C.3 Bref descriptif des thématiques de recherche dans le domaine d'expertise du CNR

L'expertise des membres du CNR concerne les domaines :

- Microbiologique des bactéries du complexe *diphtheriae* ;
- Moléculaire aussi bien au niveau de l'identification des différentes espèces que de leur détection dans les prélèvements biologiques ;
- Protéomique au niveau de la détection de l'expression de la toxine

C.4 Capacités techniques actuelles du laboratoire dans le domaine spécifique du CNR

C4.1 Liste des techniques pour le diagnostic/identification, typage évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

Les techniques d'identification des bactéries sont des techniques classiques : Gram, API Coryne, tests Rosco, Hiss sérum.

La recherche du gène *tox* se fait par PCR après extraction du matériel génétique soit de la bactérie, soit des prélèvements biologiques.

La production de la toxine est recherchée par le test Elek. Le sérum nous est fourni par l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg.

La sensibilité aux antibiotiques de tous les isolats est réalisée à l'aide de la technique des disques. Les diamètres critiques retenus sont ceux définis dans les recommandations 2008 de la Société Française de Microbiologie. Lorsqu'un isolat a une sensibilité intermédiaire ou est résistant, sa CMI est déterminée à l'aide de la technique du E test.

C4.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles

C4.2.1 Description : nombre et caractérisation de souches de référence et d'isolats cliniques

Notre collection regroupe plus d'une centaine d'isolats reçus au CNR entre 2000 et 2010 et 85 souches de référence conservés aussi à la Collection de l'Institut Pasteur (CIP). L'ensemble de ces isolats a été re-caractérisé, en ce qui concerne le biotype et la présence du gène *tox*. L'expression de la toxine diphtérique a été analysée à l'aide du test Elek sur tous les isolats porteurs du gène *tox* dans leur chromosome, ce qui n'avait jamais été fait.

C4.2.2 Conditions de stockage

Tous les isolats reçus au laboratoire et ceux de la collection sont conservés en double dans deux congélateurs à -80°C différents, chacun branché sur une ligne électrique indépendante et sous surveillance électronique 24h/24h par un système d'alarme géré par le logiciel Oceansoft.

C4.2.3 Typage des bactéries

De plus, une partie des isolats a été typés avec la nouvelle technique récemment développée du « Multi Locus Sequence Typing » (MLST) (2).

C4.2.4 Conditions de mise à disposition de ces collections

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement -MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou pas à une contrepartie financière.

Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. L'unité de recherche reconnue CNR, de part la valorisation de son savoir-faire et de son expertise sur le matériel biologique concerné, reste détenteur des prélèvements biologiques et données associées ou propriétaire des droits existants sur les souches et données associées y afférant.

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords :

- le partenaire s'engage à n'utiliser les souches, les prélèvements biologiques et données associées que dans le cadre d'un programme de recherche défini spécifiquement.
- les résultats issus du programme de recherche devront systématiquement être communiqués par le partenaire au CNR ; le CNR sera également associé ou remercié dans les publications et/ou aux communications.
- le tiers partenaire s'engage à ne pas transférer les souches, les prélèvements biologiques et les données associées à des tiers et à retourner ou détruire le matériel biologique à la fin du programme de recherche.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique et veille à ce que la valorisation du savoir-faire et de l'expertise du CNR ayant conservé, traité, trié et analysé le matériel biologique soit garantis au titre de l'accord.

Lorsque le matériel biologique et les données associées sont mis à disposition dans le cadre d'une collaboration scientifique par laquelle les partenaires s'associent de manière plus conséquente à la réalisation du programme de recherche, la valorisation des travaux menés conjointement devra tenir compte des apports respectifs de chacun des partenaires.

Les accords excluent toute garantie relative (i) à la nature appropriée des souches, des prélèvements biologiques et données associées pour une utilisation spécifique et (ii) à la qualité non-infectieuse du matériel biologique.

L'interdiction de l'utilisation du matériel biologique sur l'homme et sur les animaux, le cas échéant, est également stipulée dans l'accord.

Enfin, le CNR n'assume aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES

D BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2006-2010)

D.1 Les activités au titre de l'expertise microbiologique

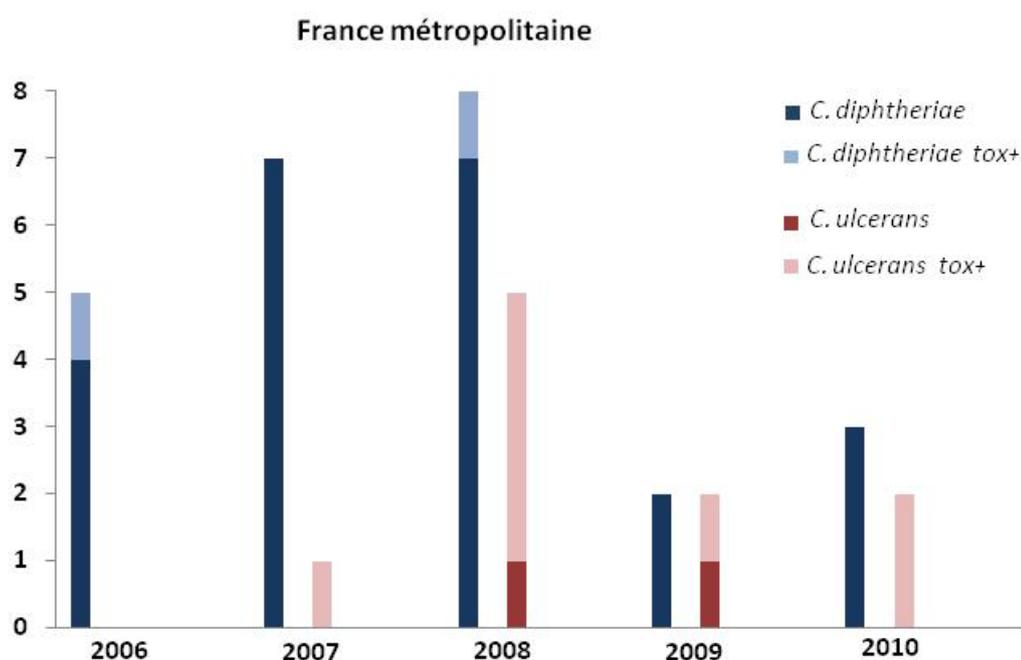
D1.1 Nature des échantillons biologiques étudiés

L'ensemble des prélèvements biologiques reçus au laboratoire est géré informatiquement à l'aide du logiciel Lagon. Les prélèvements biologiques (expectorations, prélèvements nasal, sérums, prélèvements cutanés, pus, membranes) que nous avons reçus depuis 2006 provenaient essentiellement :

- des microbiologistes hospitaliers de France métropolitaine ;
- des microbiologistes de Mayotte ou de Nouvelles Calédonie.

D1.2 Nombre de prélèvements et d'isolats cliniques reçus entre 2006 et 2010

Entre 2006 et 2010, nous avons reçu ou isolé (Figure 1)



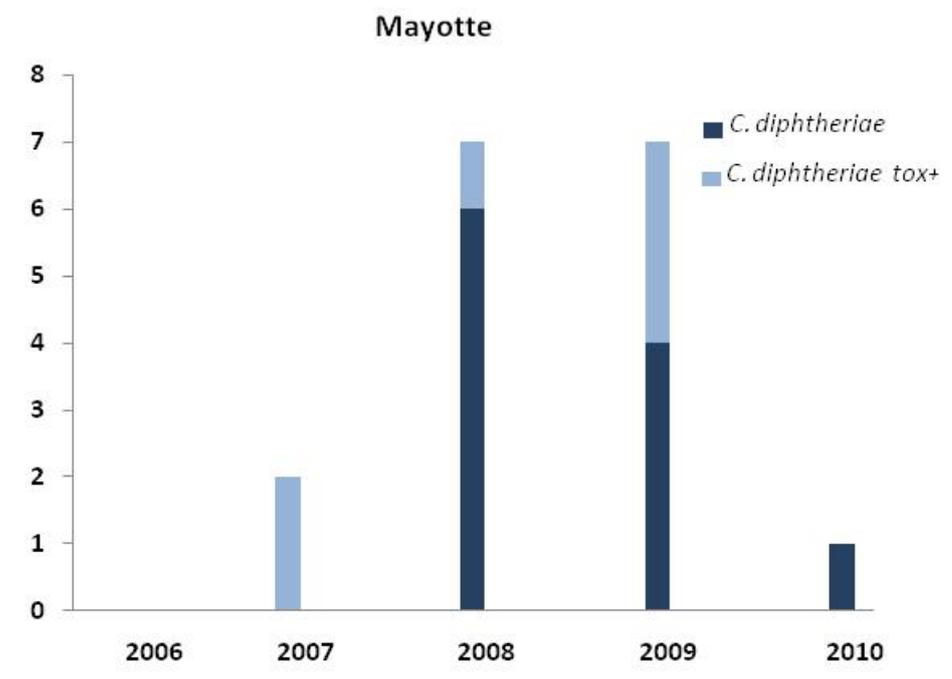
France métropolitaine :

26 *C. diphtheriae* : Deux isolats sont porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique et produisent la toxine (un collecté (*C. diphtheriae mitis*) en 2006 chez un sujet de sexe masculin âgé de 45 ans présentant une plaie au tibia et un collecté (*C. diphtheriae gravis*) en 2008 chez une femme de 70 ans de retour d'un voyage à Saint Petersburg et présentant une diphtérie classique avec fausses membranes). **Les 24 autres isolats ne portent pas le gène *tox* dans leur matériel génétique.** Ils se divisent en 10 collectés sur des plaies et 14 dans des sécrétions nasales, des expectorations ou des prélèvements pharyngés.

Il est important de signaler le cas FRC43 (*C. diphtheriae belfanti*), homme de 60 ans, correctement vacciné (titre de 0,25UI/ml) qui présentait des fausses membranes au niveau du larynx alors que seules des bactéries ne portant pas le gène *tox* ont pu être isolées. Il n'y a pas eu de transmission aux membres proches de la famille (conjoint et fils).

10 *C. ulcerans* : Sept isolats sont porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique mais trois seulement produisent la toxine (un collecté en 2007 chez un sujet femme âgée de 54 ans présentant une angine, un collecté en 2008 chez un homme de 28 ans présentant une plaie et un collecté en 2009 chez une femme de 84 ans présentant des fausses membranes, une dyspnée, une disphonie mais pas d'atteinte cardiaque). **Les 3 autres isolats ne portent pas le gène *tox* dans leur matériel génétique.** Dans deux cas, il s'agit de bactéries isolées sur des plaies. Il n'y a pas eu de transmission inter-humaine. Chez ces 7 patients, 2 avaient un contact avec un animal de compagnie. Pour les 5 autres il n'a pas été possible d'avoir le renseignement.

Il est important de signaler le cas FRC58 du à *C. ulcerans* (isolat porteur du gène *tox* dans son matériel génétique mais qui ne produit pas la toxine) chez une femme qui présentait des fausses membranes. Les cas traités jusqu'en 2009 ont été publiés (3).



Mayotte

16 *C. diphtheriae* : Cinq isolats sont porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique et tous produisent la toxine [un collecté en 2008 (*C. diphtheriae gravis*) chez un nourrisson trop jeune pour être vacciné, qui présentait une diphtérie classique et qui en est décédé, un collecté en 2009 sur un prélèvement de gorge (*C. diphtheriae mitis*) chez une femme en contact avec un patient ayant une infection génitale (*C. diphtheriae mitis*) et un autre collecté en 2009 (*C. diphtheriae mitis*) sur une plaie. **Les 11 autres isolats ne portent pas le gène *tox* dans leur matériel génétique.** Dans 8 cas, il s'agit de bactéries isolées à partir de plaies (*C. diphtheriae mitis*) et dans trois cas de prélèvements ORL (*C. diphtheriae mitis*).

Nouvelle Calédonie

2 C. diphtheriae : les deux isolats ne sont pas porteurs du gène *tox* dans leur matériel génétique. Un isolat a été collecté dans une hémoculture (*C. diphtheriae gravis*) et un à partir d'un prélèvement de gorge (*C. diphtheriae belfanti*).

Dans un certain nombre de cas en 2008 et en 2010, nous n'avons pas reçu un isolat à tester mais des prélèvements sur des cas contacts ou sur l'entourage du cas.

Ex : le cas FRC18 : cas importé de Saint Petersburg, **103 prélèvements** de cas contacts

Ex : le cas FRC58 : cas d'infection ORL avec fausses membranes, **48 prélèvements** de cas contacts

D1.3 Antibio-résistance des isolats du complexe *diphtheriae* collectés entre 2008 et 2010

Parmi les techniques que nous avons mises en place dans le CNR depuis de notre prise de responsabilités en 2008 il y a la détection de la sensibilité des isolats aux antibiotiques.

Dans un premier temps nous avons utilisé la méthode de disques, mais, depuis novembre 2010 nous avons commencé en parallèle la confirmation des résultats de susceptibilité intermédiaire ou résistance avec la méthode E-test qui détermine quantitativement la CMI de chaque antibiotique. Nous comptons dans un futur proche faire une analyse rétrospective de tous les isolats obtenus au CNR avec cette méthode E-test.

C. diphtheriae : Tous les isolats obtenus entre 2008 et 2010 sont résistants à la fosfomycine et sensibles à la rifampicine et à l'amoxicilline. Par contre, 76% des isolats ont une susceptibilité intermédiaire, ou sont résistants, à la pénicilline. Nous avons fait un « sondage » préliminaire sur quelques isolats pour déterminer la CMI pour la pénicilline et avons trouvé une CMI moyenne de 0,37 µg/ml, ce que confirme la tendance à la résistance à cet antibiotique chez les *C. diphtheriae*. Sept pour cent des isolats sont résistants à l'érythromycine (macrolides) et 40% intermédiaires pour céfotaxime (céphalosporines) 10 % à la ciprofloxacine (fluoroquinolones).

Un isolat s'est avéré résistant au Triméthoprime (TMT)-sulfaméthoxazole (SSS). Marie- Cécile Ploy et Olivier Barraud du CHU Dupuytren à Limoges ont démontré que cet isolat possède dans son matériel génétique un intégron de classe 1 avec la cassette *dfrA16* (résistance au TMP) et le gène *sul1* (résistance au SSS). C'est la première fois qu'un intégron de classe 1 est détecté dans le genre *Corynebacterium* **(une affiche a été présentée à l'ICAAC 2010 à Boston, Etats-Unis voir annexe 1 et un manuscrit a été soumis pour publication)**

C. ulcerans : la majorité (90%) des isolats sont résistants à la clindamycine et 50% résistants à la pénicilline.

D1.4 Développement d'une technique moléculaire d'identification des trois espèces du complexe *diphtheriae*

L'identification des trois espèces, entrant dans le cadre de la nouvelle définition de la diphtérie, est actuellement basée sur un nombre réduit de caractères phénotypiques et bactériologiques. Le développement de méthodes moléculaires s'impose et devrait permettre de confirmer le résultat de l'identification bactériologique.

Le CNR a donc mis en place des tests moléculaires permettant de détecter des cibles spécifiques sur le matériel génétique de l'isolat ou contenu dans le prélèvement reçu au CNR :

- un test PCR permettant d'identifier l'espèce *C. diphtheriae* (basée sur la publication de Pimienta et al., Mol. Cell. Probes, 2008, 22 :189) et ayant comme cible le gène *dtxR* ;
- un test PCR multiplex permettant de différencier l'espèce *ulcerans* de celle de *pseudotuberculosis* (basée sur la publication de Pacheco LG, Pena RR, Castro TL, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. J. Med Microbiol. 2007 Apr;56(Pt 4):480-6) et ayant comme cible les gènes *rpoB* et *pld*.

D1.5 Participation aux contrôles qualité

Nous avons participé aux contrôles qualité organisés par le Centre OMS dans le cadre du réseau DIPNET en 2008 (5) et EDSN en 2010 (manuscrit en préparation) avec succès.

D.2 Recherches effectuées par l'unité de recherche

D2.1 Développement d'une technique de typage des *C. diphtheriae*

Dans le cadre du contrat européen DIPNET, P. Grimont avait en charge le typage des isolats de *C. diphtheriae* par la technique de ribotypage qui permet d'analyser le polymorphisme génétique des loci portant les ARN16S et 23S. Cependant l'interprétation des données obtenues avec cette technique est très subjective. De plus, le logiciel utilisé pour cette analyse et pour assigner les ribotypes est obsolète et ne peut plus être utilisé avec le matériel informatique actuel. Enfin, cette technique est très difficilement transférable à d'autres laboratoires.

Il était donc nécessaire de pouvoir disposer dans les meilleurs délais au CNR d'une technique de typage simple, rapide, non ambiguë, reproductible et facilement transférable. Nous avons donc décidé d'utiliser la technique de Multi Locus Sequence Typing (MLST) qui permet un typage moléculaire par analyse du polymorphisme de séquences nucléotidiques de sept gènes de ménage. Cette technique qui repose sur des gènes très conservés dans le temps, permettra de comparer les isolats collectés lors de cas groupés ou dans des zones géographiques différentes. Pour cela, nous avons collaboré avec C. Downson (Université de Warwick, Grande Bretagne) qui a mis au point la technique de MLST sur les *C. diphtheriae*. Le travail de collaboration a été publié (2). La technique est à ce jour en place au laboratoire et nous sommes curateur de la base de données MLST Corynebactéries (<http://pubmlst.org>) ; cette base sera par la suite accessible au public. Tous les isolats reçus au CNR sont maintenant systématiquement typés par MLST.

Par ailleurs, nous collaborons avec P. Cassidy (CDC, Etats-Unis) afin de typer les 86 souches de référence de chaque ribotype définis par P. Grimont [Grimont P, Grimont F, Efstratiou A, De Zoysa A, Mazurova I, ruckly C, Lejay-Collin M, Martin-Delautre S, Regnault B, and members of the European Laboratory Working group on Diphtheria. International nomenclature for *Corynebacterium diphtheriae* ribotypes. (2004) *Res Microbiol* 155:162-166] par MLST afin de comparer les deux techniques. Toutes les souches de référence ont été typées par MLST mais aussi ribotypées à l'aide d'un riboprinteur automatique (**tableau 1**). Nous avons pu constater que dans la majorité des cas (83%), à un ribotype correspond un ST (type MLST). Dans 6 cas, la technique de ribotypie semble plus discriminante puisqu'à un ST correspond plusieurs ribotypes (ST 5, 8, 44, 46, 67, 116). Cependant, il reste à vérifier qu'un ribotype ne correspond bien qu'à un ST et non à plusieurs, cela en analysant des isolats à qui étaient assignés un ribotype semblable aux souches de référence. Quoiqu'il en soit, la technique du MLST permet d'établir des associations et des degrés de similarité, grâce à l'analyse des allèles entre les isolats, ce qui ne permet pas la ribotypie.

Tableau 1 : Comparaison des ribotypes et des différents types obtenus par MLST (ST)

CIP #	Ribotype	Biotype	CIP tox	ELEK	MLST ST
100721	New-York	<i>Cd mitis</i> (publié <i>gravis</i>)	negative	nd	26
107502	Constantine	<i>Cd mitis</i>	positive	-	116
107503	Lyon	<i>Cd gravis</i>	positive	+	25
107504	Pakistan	<i>Cd gravis</i>	positive	+	8
107505	Ras-el-Ma	<i>Cd mitis</i>	negative (publié +)	-	116
107506	Baltik	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	146
107507	Bangladesh	<i>Cd mitis</i>	negative	nd	131
107508	Beaujon	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	132
107509	Berlin	<i>Cd mitis</i>	positive	+	150
107510	Bethune	<i>Cd mitis</i> (publié <i>gravis</i>)	negative	nd	140
107512	Bristol	<i>Cd mitis</i>	positive	+	14
107513	Broussais	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	128
107514	Buri	<i>Cd mitis</i>	positive (publié -)	+	161
107515	Buriram	<i>Cd gravis</i>	negative (publié +)	-	123
107517	Cairns	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	122
107518	Carribbean	<i>Cd mitis</i>	positive	+	4
107519	Cluj	<i>Cd gravis</i>	negative (publié +)	-	5
107520	Constanta	<i>Cd belfanti</i> (publié <i>intermedius</i>)	negative	nd	162
107521	Dagestan	<i>Cd mitis</i>	negative (publié +)	-	118
107522	Darling	<i>Cd gravis</i>	negative (publié +)	-	147
107523	Danmark	<i>Cd mitis</i>	positive	+	121
107524	Dominca	<i>Cd mitis</i>	positive	+	11
107525	Erlabrunn	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	5
107526	Gallia	<i>Cd mitis</i>	negative (publié +)	-	130
107527	Gambia	<i>Cd mitis</i>	positive (publié -)	+	16
107528	Gatchina	<i>Cd gravis</i>	positive	+	9
107529	Goteborg	<i>Cd mitis</i>	positive (publié -)	+	
107530	Goettingen	<i>Cd belfanti</i>	negative	nd	15
107531	Greifswald	<i>Cd belfanti</i>	negative (publié +)	-	42
107532	Ho-Chi-Min	<i>Cd mitis</i>	positive	+	151
107533	Iasi	<i>Cd mitis</i> (publié <i>intermedius</i>)	positive	-	46
107534	Kaliningrad	<i>Cd mitis</i> (publié <i>gravis</i>)	positive	+	17
107535	Kempsey	<i>Cd gravis</i>	negative (publié +)	-	133
107536	Le Havre	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	135
107537	Londinium	<i>Cd mitis</i>	negative (publié +)	-	152
107538	Lonjumeaux	<i>Cd mitis</i>	negative	nd	134
107539	Manchester	<i>Cd mitis</i>	positive	+	165
107540	Marseille	<i>Cd mitis</i>	negative (publié +)	-	153
107541	Minsk	<i>Cd gravis</i>	positive	+	10
107542	Moskva	<i>Cd mitis</i>	positive	-	40
107543	Nan	<i>Cd mitis</i>	positive (publié -)	+	141

CIP #	Ribotype	Biotype	CIP tox	ELEK	MLST ST
107544	Neamt	<i>Cd mitis</i> (publié <i>intermedius</i>)	negative	nd	155
107545	Nedlands	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	148
107546	Otchakov	<i>Cd mitis</i>	positive	+	157
107547	Pamiers	<i>Cd mitis</i>	positive	+	3
107548	Paris	<i>Cd belfanti</i>	negative	nd	163
107549	Perth	<i>Cd mitis</i>	negative	-	119
107550	Peru	<i>Cd gravis</i>	positive	+	149
107551	Prahova	<i>Cd belfanti</i> (publié <i>intermedius</i>)	negative	nd	164
107552	Prathet-Thai	<i>Cd mitis</i>	positive (publié -)	+	209
107554	Przemysl	<i>Cd mitis</i> (publié <i>intermedius</i>)	positive	+	44
107555	Roma	<i>Cd mitis</i>	negative (publié +)	-	154
107556	Romania	<i>Cd belfanti</i>	negative	nd	166
107557	Rossija	<i>Cd gravis</i>	positive	+	8
107558	Saigon	<i>Cd mitis</i>	positive	+	159
107559	St-Albans	<i>Cd mitis</i>	positive	+	20
107560	Sankt-Peterburg	<i>Cd gravis</i>	positive	+	158
107561	Schwarzenberg	<i>Cd mitis</i>	negative	nd*	117
107563	Somalia	<i>Cd mitis</i>	positive	+	6
107564	Strasbourg	<i>Cd belfanti</i>	negative	-	
107565	Suceava	<i>Cd gravis</i> (publié <i>intermedius</i>)	negative	nd	145
107566	Sveridge	<i>Cd mitis</i>	positive	-	1
107567	Swansea	<i>Cd mitis</i>	positive	+	21
107568	Sweden	<i>Cd belfanti</i>	negative	nd	170
107569	Sydney	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	120
107570	Tamper	<i>Cd gravis</i>	positive	+	127
107571	Thai	<i>Cd mitis</i>	negative (publié +)	-	129
107572	Thailand	<i>Cd mitis</i>	positive (publié -)	+	13
107573	Tooting	<i>Cd mitis</i>	positive	+	126
107574	Tourcoing	<i>Cd belfanti</i>	negative	nd	160
107575	Tunisie	<i>Cd mitis</i>	positive (publié -)	+	67
107576	Viborg	<i>Cd gravis</i> (publié <i>mitis</i>)	positive	+	8
107577	Victoria	<i>Cd mitis</i>	positive (publié -)	+	125
107578	Viet-Nam	<i>Cd mitis</i>	positive	+	67
107579	Vladimir	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	32
107580	Vrancea	<i>Cd mitis</i> (publié <i>intermedius</i>)	positive (publié -)	+	46
107581	Washington	<i>Cd gravis</i>	positive	-	
107582	Westmead	<i>Cd gravis</i>	negative	nd	124
80-56	Versailles	<i>Cd mitis</i>	negative	-	156
A102	America	<i>Cd mitis</i> (publié <i>gravis</i>)	positive	+	44
A99	Rhone	<i>Cd mitis</i> (publié <i>intermedius</i>)	positive	-	67

*nd = non déterminé car l'isolat ne porte pas le gène tox

D2.2 Collaboration avec le Brésil

Nous avons initié une collaboration avec l'équipe de V. Azevedo expert des *C. pseudotuberculosis* d'origine animale afin de comparer les isolats d'origine animale et d'origine humaine. A ce jour, il n'y a en France que deux infections humaines à *C. pseudotuberculosis*. Ces isolats ne sont pas porteurs du gène *tox*, comme les isolats d'origine animale, et sont à l'origine de lymphadénite, ce qui est observé dans les troupeaux de caprins infectés.

Le séquençage du génome d'un des isolats a été réalisé (1). Il s'avère que la taille du génome est de 2337Kda avec 2110 gènes et son pourcentage en GC de 52,2%. Le séquençage a révélé non seulement le gène codant la phospholipase mais aussi des gènes codant des protéases à sérine, une neuraminidase H, une nitric oxide réductase, une acyl-CoA carboxylase, une protéine impliquée dans la biosynthèse de l'acide mycolique, des protéines qui pourraient avoir un rôle dans la virulence de la bactérie. L'isolat d'origine humaine dont le génome a été séquencé est donc équipé avec une série de gènes codant des protéines lui permettant de survivre chez l'hôte.

D2.3 Quelle est l'immunité de la population adulte vaccinée selon les recommandations françaises contre le tétanos, la diphtérie et la coqueluche ?

L'objectif de l'étude était d'évaluer le titre en anticorps (Ac) anti-diphtérie, tétanos et coqueluche (anti-PT) dans une population adulte vaccinée selon les recommandations françaises. Cette étude séro-épidémiologique prospective, transversale, a été réalisée dans 7 centres de vaccination français chez des sujets de 18 à 60 ans ayant reçu au moins 6 doses de vaccin contre la diphtérie et le tétanos et pour les sujets de moins de 40 ans au moins 4 doses de vaccin contre la coqueluche. Les données de 331 sujets ont été analysées : ces adultes vaccinés selon les recommandations vaccinales françaises étaient considérés comme protégés à 98,5% contre le tétanos, mais seulement à 86,7% contre la diphtérie (62,7% seulement pour les 50-60 ans). Des titres d'anticorps anti-PT suggérant une infection récente par *Bordetella pertussis* étaient observés dans 7,4% des cas et jusqu'à 13,1% des jeunes adultes entre 18 et 29 ans. Ces résultats soulignent l'importance des nouvelles recommandations vaccinales concernant les rappels vaccinaux contre la diphtérie et la coqueluche chez l'adolescent et à l'âge adulte (4).

D.3 La contribution à la surveillance épidémiologique ou à l'alerte

D3.1 Europe

Nous avons fait partie du réseau DIPNET coordonné par le centre OMS situé au Royaume Uni. Ce réseau a été arrêté et maintenant tous les pays européens font partie du réseau coordonné par l'ECDC.

Par ailleurs, nous collaborons avec l'Institut Cantacuzène (Roumanie) et la Biélorussie pour la surveillance épidémiologique au niveau microbiologique.

D3.2 International

Nous collaborons avec plusieurs régions ou pays tels la région de Saint Petersburg, l'Algérie et le Brésil.

D3.3 Alerte

Lorsque le CNR détecte la présence du gène *tox* dans une bactérie il contacte l'InVS par téléphone et par courriel (diphtherie-invs@invs.sante.fr) ainsi que le laboratoire expéditeur. Il y a eu quatorze alertes entre 2006 et 2010.

Si une surcharge exceptionnelle de travail se présentait, le CNR pourra demander l'aide de la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU). La CIBU une entité d'appui logistique, technique et scientifique, permettant à l'ensemble des Centres Nationaux de Référence (CNR) situés à l'Institut Pasteur, de répondre efficacement aux "urgences biologiques spécialisées". Le bioterrorisme est le premier et le principal phénomène concerné par ces urgences qui nécessitent de pouvoir dégager rapidement les moyens supplémentaires en personnel, en équipement (matériels et petits et gros équipements) et en locaux adaptés.

Le réseau national des laboratoires Biotox-Piratox est une des composantes des plans nationaux de sauvegarde des populations. L'organisation générale du réseau est articulée en trois niveaux de compétence : 1/ les laboratoires sentinelles, 2/ les laboratoires de zones de défense et 3/ les laboratoires à compétence nationale qui comprennent les Centres spécialisés dans un agent ou un groupe d'agents comme les CNR, la CIBU et les laboratoires spécialisés dans des équipements, dans un mode de fonctionnement ou dans une expertise transversale à différents agents (matrices particulières). Il met ainsi à la disposition des autorités locales et nationales une capacité de réponse flexible et adaptée aux actes malveillants ou alertes mettant en cause des agents biologiques ou des toxiques de guerre ou industriels.

Le conseil scientifique du réseau national des laboratoires Biotox-Piratox, instauré en 2004 sous l'égide du SGDN, avait pour mission prioritaire de réaliser la cartographie des laboratoires nationaux capables de fournir aux autorités une capacité d'expertise adaptée aux situations de crise. Ce conseil a également pour mandat d'assurer l'animation scientifique du réseau. Les responsables de la CIBU participent au Conseil scientifique du Réseau national des laboratoires Biotox-Piratox. Ils

sont ainsi à même d'informer et de contribuer à former les CNR concernés sur les aspects de biosécurité, de double usage et du respect de la réglementation visant les MOT.

Les actions mises en œuvre par la CIBU ont pour objectif la rapidité et l'efficacité des réponses aux situations d'urgence. Elle intervient selon deux modes : 1/ un mode direct où elle agit en tant que laboratoire autonome et 2/ un mode indirect en soutien en personnel, voire en matériel et en locaux à un autre laboratoire (CNR, CCOMS).

Dans son mode direct, la CIBU constitue un laboratoire autonome participant à la caractérisation de la menace agissant en amont des CNR ou avec eux si nécessaire. Elle peut hors heures ouvrées, lorsque le CNR concerné n'est pas opérationnel, (i) se substituer à lui pour une première détection/identification voire, à un moment donné partout sur le maillage du réseau national Biotox-Piratox, (ii) palier l'absence de laboratoire référent de niveau 2 capable de répondre en amont du CNR. Le CNR *ad hoc* dans le cadre de son animation de réseau Biotox-Piratox assure le transfert de techniques et de réactifs vers la CIBU.

D.4 Conseil aux professionnels ou aux autorités de santé

Site internet du CNR-CT : <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-corynebacteries-toxinogenes/identite-et-coordonnees>

Entre 2006 et 2010, outre les cas signalés en France métropolitaine, les interactions avec le laboratoire hospitalier de Mayotte se sont aussi poursuivies, en ce qui concerne l'identification et la toxicité des bactéries.

LISTE DES PUBLICATIONS

E LISTE DES PUBLICATIONS

E.1 Publications nationales

E.2 Publications internationales

2010

1. Trost E, Ott L, Schneider J, Schroder J, Jaenicke S, Goesmann A, Husemann P, Stoye J, Alves Dorella F, Souza Rocha F, De Castro Soares S, D'afonseca V, Miyoshi A, Ruiz J, Silva A, Azevedo V, Burkovski A, **Guiso N**, Join-Lambert O, Kayal S, Tauch A. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. (2010) **BMC Genomics** 11(1):728
2. Bolt F, Cassiday P, Tondella ML, DeZoysa A, Efstratiou A, Sing A, Zasada A, Bernard K, **Rosso ML**, **Guiso N**, Baldwin A, Dowson C. Multi locus sequence typing identifies evidence recombination and two distinct lineages within *Corynebacterium diphtheriae*. **J. Clin. Microbiol** (2010) 48(11) : 4177-4185

2009

3. Bonmarin I, Guiso N, Le Fleche-Mateos A, Patey O, Grimont P, Levy-Bruhl D. Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine*, (2009) 27:4196-4200
4. Launay O, Toneatti C, Bernede C, Njamkepo E, Petitprez K, Leblond A, Larnaudie S, Goujon C, Ungeheuer MN, Ajana F, Raccurt C, Beytout J, Chidiac C, Bouhour D, Guillemot D, Guiso N. Antibodies to tetanus, diphtheria and pertussis among healthy adults vaccinated according to the French vaccination recommendations *Hum Vaccin* (2009): 5(5) 341-346
5. Neal S.E, Efstratiou A, on behalf of DIPNET and International Diphtheria reference Laboratories. International External Quality Assurance for laboratory Diagnosis of Diphtheria. *J. Clin Microbiol* (2009): 47(12) 4037-4042

E.3 Communications nationales

E.4 Communications internationales (toutes sur invitation)

2009

Guiso N.: "Toxinogenic *Corynebacteria* in France" Dipnet Steering committee (2009) Helsinki, Finlande

Guiso N.: "Human toxigenic *corynebacterium diphtheriae*, *ulcerans* and *pseudotuberculosis* circulating in France", "MLST compared to ribotyping for molecular typing of *Corynebacterium diphtheriae*" (2009) Riga, Lettonie

Badell-Ocando E. : "Evolution d'espèces bactériennes sous pression vaccinale". (2009),
réunion GDR, Paris, France

2008

Guiso N.: "Lessons from two vaccine preventable diseases: Diphtheria and Pertussis" Conseil Scientifique de l'Institut Pasteur d'Iran (2008) Téhéran, Iran

Guiso N.: "Surveillance of vaccine preventable diseases (SURVAC project)", Ministère des Affaires Etrangères et Européennes, (2008) Saint-Pétersbourg, Russia

Rosso ML.: "Surveillance of Diphtheria in France" DIPNET meeting, Chypre (2008)

2007

<http://www.eurosurveillance.org/em/v12n12/1212-225.asp> (article collectif dans
Eurosurveillance résumant la première réunion DIPNET.

E.5 Enseignements de janvier 2006 à décembre 2010

2010

Nicole GUISO

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses, exemple de la coqueluche et de la diphtérie" - Institut Pasteur – le 30 mars 2010 (3 heures)

2009

Nicole GUISO

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses, exemple de la coqueluche et de la diphtérie" - Institut Pasteur – le 9 février 2009 (3 heures)

E.6 Expertises

En 2010 participation au groupe de travail pour la modification des recommandations concernant la déclaration obligatoire des infections par les bactéries du complexe *diphtheriae*

DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE MISES EN OEUVRE

F Description des démarches qualité mises en œuvre au sein du CNR

De 2008 à aujourd'hui, en réponse aux inspections AFSSAPS relatives à la conformité aux exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux micro-organismes et toxines, une démarche d'harmonisation des systèmes de management qualité des CNR, a été réalisée.

Une politique Qualité, Sécurité, Environnement pour l'Institut Pasteur a été formalisée, validée par la Direction Générale et communiquée à l'ensemble du personnel en 2008 et mise à jour en 2011.

En septembre 2010, un état des lieux des dispositions qualité des CNR et des services supports de l'Institut assurant un appui efficace et maîtrisé aux CNR a été formalisé.

En effet, dans le cadre des démarches qualité des CNR et d'autres entités, plusieurs services supports (pôle Equipement, RH, logistique, QSE, Prévention des risques,...) ont mis en place des dispositions qualité permettant de répondre aux exigences des référentiels qualité (ISO 9001, ISO 17025, ISO 15189,...) mis en place à l'Institut Pasteur.

Plus particulièrement, la Direction déléguée Environnement-Sécurité-Logistique (ESL) a formalisé et mis à disposition des CNR les procédures qualité d'organisation, de pilotage et d'amélioration nécessaires dans le cadre des démarches selon les référentiels ISO. Elle apporte également ses ressources et son expertise pour accompagner les CNR dans leur projet d'accréditation partielle (envoi des actes de candidatures pour l'accréditation avant le 31/10/2012 et obtention de l'accréditation partielle avant le 31 mai 2013) et complète (avant le 1/11/2016) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

Un manuel qualité des CNR a été rédigé et a pour objectif la description du système de management de la qualité commun à l'ensemble des CNR.

Avancement de l'Assurance Qualité sur le CNR Corynebacteries toxinogènes

Le temps dédié au personnel du CNR pour la mise en place de l'assurance qualité et l'implication de l'équipe technique et de l'encadrement pour cette thématique a permis l'atteinte d'un niveau qualité très satisfaisant.

L'encadrement de cette structure a mis en œuvre, pour son personnel technique, les moyens nécessaires pour la mise en œuvre de la qualité pour les activités.

Cette organisation a permis la mise en place efficace d'une gestion documentaire de la qualité (procédures, modes opératoires et enregistrement) et d'une gestion du matériel, pour ses activités de diagnostic.

La gestion du matériel permet de garantir l'utilisation d'équipements fiables, appropriés aux besoins et surveillés en temps réel.

La gestion des réactifs et consommables (sélection et évaluation des fournisseurs, distribution et évaluation des produits) est assurée par le département Achats et le service Logistique.

La politique qualité de l'unité et du CNR est résumée **ci-dessous**. Des contrôles qualité intra et inter laboratoires sont régulièrement réalisés en ce qui concerne les techniques de diagnostics

biologiques des Corynebactéries toxigènes. Chacune des techniques utilisées a un mode opératoire qui est enregistré et géré sur une gestion électronique documentaire visible par le portail **Webcampus** accessible à tous les membres du CNR et de l'unité de recherche. Ces modes opératoires sont ré-actualisés régulièrement en fonction de l'évolution des techniques. Ils sont distribués aux laboratoires de bactériologie hospitaliers qui en font la demande. L'ensemble des produits utilisés ainsi que sérums et antigènes de référence est colligé dans le logiciel **LabCollector**. Enfin, la métrologie de nos équipements est gérée par le logiciel **Océasoft**.

Politique qualité de l'Unité de Recherche « Prévention et Thérapie Moléculaire des Maladies Humaines » du CNR des Corynebactéries toxigènes

La politique qualité de l'Unité PTMMH est de répondre toujours mieux :

- ▶ à ses missions de Centres nationaux de Référence et d'Unité de recherche
- ▶ aux attentes de ses correspondants : Autorités nationales de santé, Organismes internationaux, Cliniciens et Médecins, Industriels, Partenaires scientifiques.

Pour cela, l'unité a développé, depuis plusieurs années, un système de gestion de la qualité visant à accroître l'efficacité de ses fonctionnements et à garantir des résultats justes, reproductibles et transmis dans les délais.

Dans cette dynamique, voici les objectifs de l'unité pour 2010 :

- Les changements réguliers au sein de l'équipe ainsi que l'évolution des techniques nous incitent, plus que jamais, à assurer le maintien des compétences et la transmission des savoirs au sein de l'unité. Sur ce point, l'unité continuera à être particulièrement vigilante :
 - à ce que chaque technique de l'unité soit partagée par au moins deux personnes. Ce transfert de savoir et de savoir-faire se fera notamment par le biais des habilitations et de la formation ;
 - au renforcement des contrôles visant à assurer le maintien des compétences et à éviter les dérives dans la réalisation des techniques.
- Dans le cadre de ses missions de Centre National de Référence, l'unité continuera à optimiser ses délais de caractérisation des isolats et de saisie des caractéristiques dans le système informatique LAGON. Ceci, dans le but de faciliter et de rendre plus efficace l'exploitation informatique ultérieure de ces informations, lors de la surveillance ou des expertises. Pour cela, chacun continuera à optimiser l'organisation de son temps de travail via une planification efficace des manipulations et des saisies et à une meilleure prise en compte du risque de surcharge imprévue tel que les épidémies ou les cas en collectivité, en prévoyant notamment d'avantage de marges.

En tant que Responsable de l'unité, je m'engage :

- à garantir de bonnes pratiques professionnelles,
- à assurer la qualité de nos prestations au service de nos correspondants,
- à poursuivre la mise en place d'un système de gestion de la qualité qui réponde aux prescriptions de la norme ISO/CEI 15189.

Et j'invite l'ensemble du personnel à veiller au respect des politiques et des procédures dans la réalisation de ses travaux.

Nicole Guiso, Responsable de l'Unité
Actualisation le 2 février 2011

DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

G DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

Introduction sur le contexte

- Norme ISO15189 : Les LBM (laboratoires de biologie médicale) vont être tenus de mettre en place la norme ISO15189. Cette norme qui touche le laboratoire et son organisation a des impacts sur le système d'information.
- ASIP Santé (Agence des Systèmes d'Information Partagés de Santé) : L'ASIP Santé qui gouverne aujourd'hui tout le paysage des systèmes d'informations en santé impose des règles en matière de sécurité, de confidentialité et d'interopérabilité qui vont avoir à courts termes des conséquences non négligeables sur les outils informatiques utilisés par les CNR. On peut citer plusieurs points :
 - o Agrément pour l'hébergement de données médicales à caractère personnel. EpiConcept a fait un dépôt de candidature pour obtenir cet agrément et a de fait acquis une expertise réelle sur ce sujet (sécurité, juridique, fonctionnel)
 - o Accès aux informations via une authentification forte des utilisateurs (carte CPS ou CPA)
 - o Respect d'un cadre d'interopérabilité pour les échanges de données médicales avec des tiers (InVS par exemple)

La capacité du candidat à mettre en œuvre la transmission régulière et automatisée de données vers l'InVS sera décrite.

Les solutions comme Lagon (application spécifique développée pour l'activité des CNR placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur par la société Epiconcept), Voozано, de par leur modularité, leur ouverture et les technologies utilisées permettent l'extraction et la transmission de données ou la mise à disposition de données sous les formes suivantes.

- En ligne : transmission via Voozано. L'InVS a accès à des informations agrégées via un compte dédié et sécurisé. La sécurisation des transferts est assurée par le serveur Web (protocole https)
- Extraction de données agrégées ou de fichiers à plat anonymisés (feuilles Excel, fichier texte, pdf...). Le niveau de sécurisation des transferts dépend de la nature des données (individuelles ou agrégées).
- Interopérabilité / Web services : les technologies utilisées dans Lagon ou Voozано (en particulier l'exploitation native de fichiers Xml) permettent une mise en place naturelle d'interfaces pour un transfert automatique et sécurisé de données standardisées. (Ce type d'architecture est similaire à celle mise en place pour les échanges avec l'ECDC pour alimenter la base TESSy – cf. machine to machine interface to TESSy. www.ecdc.europa.eu/.../0907_TER_TESSy_Web_Service_Technical_Documentation_1.pdf).

Le laboratoire détaillera les procédures visant au respect de la conformité à la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractère personnel ou les évolutions prévues.

- Authentification : nativement, l'authentification est individuelle (personne physique) et elle s'effectue par le biais de la saisie d'un identifiant et d'un mot de passe associé. En fonction des infrastructures, elle peut être renforcée par l'utilisation d'un LDAP (Système d'annuaire centralisé). Une interface d'administration permet à l'administrateur de gérer l'ensemble des utilisateurs (révocation, changement de mot de passe, création...)
- Droits des utilisateurs / Restriction des accès : une interface dédiée permet l'association d'actions et de droits à des groupes d'utilisateurs (personnel administratif, technicien, biologiste, administrateurs...).
- Traçabilité :
 - Journalisation des accès
 - Traçabilité de toutes les actions sur la base de données du type (QUI/QUOI/QUAND)
 - Traçabilité des modifications effectuées sur le logiciel et les ressources (versionning)
- Télémaintenance : ***ce point qui dépend du CNR doit être repris à partir de la déclaration CNIL de celui-ci.***
- Sauvegarde et restauration : L'hébergement et la sauvegarde des serveurs Voozadoo et Lagon centralisés est assuré par les services informatiques de l'Institut Pasteur. En dehors d'indication particulière, ceux-ci sont sauvegardés avec une procédure classique :
 - dump quotidien des bases MySQL
 - sauvegarde complète une fois par mois conservée 1 mois.
 - sauvegarde différentielle une fois par jour, conservée 3 mois.

Le serveur est sauvegardé en une fois, pour tous les CNRs hébergés.

La sauvegarde se fait sur bande magnétique (LTO5) dans une robotique située de l'autre coté du campus par rapport à la salle serveur, pour assurer une conservation des données en cas d'incident majeur.

La sauvegarde se fait via le logiciel "Symantec NetBackup Enterprise Server 6.5".

1- Les traitements automatisés de données à caractère personnel mis en œuvre par les CNR dans leur cadre de leurs activités de surveillance et d'expertise :

Conformément aux dispositions de la loi du 6 juillet 1978 dite « Informatique et Libertés », l'Institut Pasteur a déclaré à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL)¹ les traitements de données personnelles ayant été mis en œuvre par chaque CNR dans le cadre de leurs activité d'expertise et de surveillance.

¹ Déclaration Normale, Numéro de déclaration, Récépissé reçu de la CNIL en date du 19 janvier 2011

Fiche de renseignement devant accompagner chaque envoi (téléchargeable à partir de notre site internet : <http://www.pasteur.fr/sante/>)

HOPITAL / LABORATOIRE EXPEDITEUR

Adresse complète ou cachet

Service :
 Médecin :
 Tél :
 Nom du Correspondant :
 Email :

PRELEVEMENT HUMAIN

N° de dossier de l'isolat expédié

Date du prélèvement :/...../.....

	Oui	Non
Pharyngé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nasal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sang	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

PRELEVEMENT VETERINAIRE

N° de dossier de l'isolat expédié

Date du prélèvement :/...../.....

Espèce animale
 Type de prélèvement
 Origine géographique

VACCINATION

	Oui	Non
Patient vacciné	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nombre de dose :		
Date de la dernière dose :/...../.....		
Type de vaccin :		

BACTERIOLOGIE RESULTATS DEJA OBTENUS

Date de la culture envoyée :/...../.....
 Identification :
C. diphtheriae *C. ulcerans* *C. sp*
 Coryneforme *C. pseudotuberculosis*
 Autre résultat :

PATIENT

Nom : Prénom :
 Date de naissance :/...../..... M F
 Ville de résidence
 Code postal :

	Oui	Non
Cas isolé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autre cas dans l'entourage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nombre de cas		
Animaux dans l'entourage		

CONTEXTES CLINIQUES

	Oui	Non
Diphthérie clinique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Suspicion de diphthérie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Recherche de portage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Angine/pharyngite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Infection extra-pharyngée	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plaie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autre		
.....		
.....		
Hospitalisation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE

	Oui	Non
Traitement avant prélèvement	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si oui, durée :		
Antibiotique administré :		
.....		

ANALYSES DEMANDEES

- Détection du gène de la toxine
- Confirmation de l'identification
- Antibiogramme
- Ribotypie et comparaison avec la base de données OMS des Ribotypes de *C. diphtheriae*

Examen gratuit dans le cadre du CNR

Le CNR exerce des missions de santé publique grâce au matériel biologique transmis et aux renseignements les accompagnant. Ces activités sont assumées à titre gracieux sous réserve du respect des modalités d'expédition des souches et de la fourniture des renseignements se référant à ces produits biologiques. Le directeur du CNR est seul juge de la finalité des actes qu'il effectue et de leur gratuité.

**Questionnaire à joindre pour tout envoi et à retourner au
 CNR des Corynebacteries Toxinogènes
 INSTITUT PASTEUR
 25-28 Rue du Docteur Roux
 75724 PARIS Cedex 15**

**N. Guiso - E. Badell-Ocando
 Email : coryne@pasteur.fr
 Tél : 01.45.68.83.34
 Fax : 01.40.61.35.33**

Ne pas remplir

Cette déclaration comporte l'engagement que le traitement satisfait aux exigences de la loi notamment en ce qui concerne, les droits des personnes dont les échantillons et données collectées sont susceptibles d'être utilisés à des fins de recherche. A ce titre, l'Institut Pasteur a élaboré le document ci-joint. L'information et le consentement des personnes porte sur :

- le fait que les échantillons et données collectés puissent faire l'objet d'une transmission aux CNR pour une utilisation secondaire à des fins de recherche
- leurs droits d'information, d'opposition, d'accès et de rectification.

Les traitements répondent à la finalité principale suivante :

suivi et traitement des données relatives au matériel biologique (souches et prélèvements) reçu par le Centre National de Référence (CNR) dans le cadre de ses missions et conformément au cahier des charges, à des fins de caractérisation des souches et ou de diagnostic, et de surveillance épidémiologique. De la réception du matériel biologique jusqu'au rendu des résultats, les données permettent un suivi éventuel du patient et de phénomènes épidémiques.

2- Les traitements automatisés de données à caractère personnel mis en œuvre par les CNR dans leur cadre de leurs activités de recherche :

En complément de leurs activités de surveillance et d'expertise, les CNR ont également une activité spécifique de recherche dont l'objectif est de faire progresser les connaissances sur les maladies infectieuses et notamment sur les microorganismes qui y sont associés.

Dans le cadre de leurs missions de recherche, les CNR respectent les dispositions du chapitre IX de la loi du 6 janvier 1978 telle que modifiée par la loi du 6 août 2004, relatif aux traitements automatisés de données à caractère personnel ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé, qui autorise, sous certaines conditions, les transmissions de données médicales nominatives entre professionnels de santé et organismes de recherche tout en définissant les droits des personnes concernées.

En application de ces dispositions, un avis du Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) et une autorisation de la CNIL sont requis.

L'Institut Pasteur a initié une démarche auprès du président du CCTIRS afin de mettre en place une procédure centralisée permettant d'informer et de recueillir l'avis du CCTIRS préalablement aux demandes d'autorisation auprès de la CNIL. L'Institut Pasteur est dans l'attente du retour du président du CCTIRS pour la mise en place effective de cette procédure.

L'ensemble des données renseigné sur le formulaire **ci-contre** accompagnant concernant les isolats cliniques reçus au laboratoire, est géré informatiquement par le logiciel Lagon (EpiConcept) ;

Enregistrer auprès de la CNIL pour la confidentialité **n° de déclaration 1474593 v 0**

PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2012-2016

H PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2012-2016

H.1 Projets du CNR

Les projets sont fonction du cahier des charges.

H1.1 Constitution d'une collection

La poursuite de cette collection ne sera possible que si les microbiologistes hospitaliers envoient leurs isolats cliniques au CNR. La collection des isolats est très importante afin de surveiller la nature et l'évolution des isolats, et de poursuivre la constitution d'une banque de données unique, comme il a pu être constaté les années précédentes.

H1.2 Développement de la PCR en temps réel pour détecter le gène de *tox* directement dans les prélèvements biologiques

Ce développement n'a pu être réalisé l'an dernier en raison du développement de la technique de typage. La détection du gène *tox* est déjà réalisée au CNR mais l'utilisation de la PCR en temps réel devrait rendre la détection plus sensible. Différentes PCR temps réel de détection du gène *tox* ont été décrites à ce jour [Schuhegger R., Lindermayer M., Kugler R., Heesemann J., Busch U., Sing A. *Detection of Toxigenic Corynebacterium diphtheriae and Corynebacterium ulcerans strains by a novel Real-Time PCR.* (2008) *J. Clin Microbiol* 46(8):2822-2823 ; Mothershed E.A., Cassidy P.K., Pierson K., Mayer L.W., Popovic T. *Development of a Real-Time Fluorescence PCR assay for rapid detection for the diphtheria toxin gene.* (2002) *J. Clin Microbiol* 40(12): 4713-4719] mais elles ne sont pas complètement optimisées et il sera nécessaire de les valider sur des prélèvements humains.

H1.3 Analyse temporelle de la sensibilité aux antibiotiques

Comme il est mentionné dans le chapitre D.1.3, nous allons procéder à une analyse rétrospective de l'antibio-résistance des isolats qui ont été reçus au CNR. Pour ce faire nous utiliserons la technique des disques et pour tout isolat dont la sensibilité est diminuée la détermination de la CMI sera faite avec le E-test.

H1.4 Développement d'un test de dosage des anticorps anti-toxine diphtérique

La mesure de la protection des individus vaccinés contre la diphtérie se fait à l'aide de la détermination des titres d'anticorps antitoxine diphtérique dans leurs sérums *in vitro*, par la technique ELISA. Mais l'activité biologique réelle de ces anticorps n'est pas évaluée avec les kits commerciaux. La technique de sero-neutralisation permet de mesurer l'activité biologique des anticorps anti-toxine *in vitro* et donc de compléter l'analyse du niveau de protection des individus vaccinés. Cette technique se base sur la capacité de la toxine diphtérique à tuer les cellules. En présence d'anticorps anti-toxine cette activité cytotoxique est inhibée. Cela se traduit par la formation d'un tapis cellulaire homogène, confluent, au fond des plaques de 96 puits dans lesquels le test est réalisé. Ce tapis est mis en évidence par la coloration de Giemsa. Au contraire, dans les puits où il n'y a pas eu de neutralisation de la toxine, on observe la formation d'un tapis très peu

confluent, voire pas de tapis du tout. Nous envisageons, donc, de comparer le dosage des anticorps anti-toxine diphtérique par la technique de sero-neutralisation avec celui réalisé avec des kits commerciaux. E. Badell-Ocando est allé se former dans le Laboratoire de Référence Italien et va essayer de mettre en place ce test au CNR.

H.2 Projets de l'unité de recherche en relation avec le CNR

H2.1 Poursuite de la comparaison de la technique de ribotypie avec la technique de MLST

Nous nous proposons de poursuivre la comparaison entre les techniques de typage par ribotypie et par MLST en l'élargissant aux isolats obtenus dans d'autres pays tels que la Roumanie, l'Algérie et la Russie. En Algérie et en Roumanie, la circulation des isolats est très faible grâce à une vaccination élevée d'une grande partie de la population tandis qu'en Russie la diphtérie est endémique et la vaccination n'est toujours pas à son maximum. L'objectif est d'évaluer si les isolats circulants varient selon la pression vaccinale.

Pour ce faire nous avons commencé depuis 2010 une collaboration entre les Instituts Pasteur d'Algérie et de Saint Petersburg ainsi que l'Institut Cantacuzène de Roumanie.

H2.2 Développement de la technique de typage MLST pour les espèces *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*

Le nombre d'infections à *C. ulcerans*, en particulier *tox +*, est en augmentation aussi bien en France (3) qu'à l'étranger (*Wagner, Bacteriol 2010*). Nous avons observé que la moyenne d'âge des individus infectés par *C. ulcerans* est assez élevée. Cela peut être le résultat d'au moins trois facteurs :

- la couverture vaccinale faible chez les adultes. En effet, même si l'impact de la vaccination diphtérique pour la prévention des infections à *C. ulcerans* est inconnu, on peut supposer que la vaccination par l'anatoxine diphtérique induit une immunité protectrice contre l'exotoxine de *C. ulcerans* car les deux exotoxines possèdent 95% de similarité au niveau de leurs séquences en acide aminés. Cependant ceci est à vérifier et le séquençage des gènes codant plusieurs exotoxines est à réaliser ;
- jusqu'en 2005, les rappels diphtériques adultes ne faisaient pas l'objet de recommandations ce qui peut expliquer la faible couverture des plus de quarante ans. De plus, la population vieillissant, le nombre de personnes susceptibles augmente ;
- l'importance des animaux domestiques pouvant servir de réservoir de *C. ulcerans* reste à être précisé. Cependant, leur nombre élevé auprès des personnes âgées suggère qu'ils pourraient jouer un rôle dans l'augmentation du nombre d'infections à *C. ulcerans* chez les patients âgés non revaccinés.

Un typage des isolats de *C. ulcerans* par une technique fiable, reproductible autorisant des comparaisons inter-laboratoire pourrait donc permettre de mieux connaître la répartition temporelle et géographique des isolats et leur transmission de l'animal à l'homme du même que pour *C.*

pseudotuberculosis. Pour ce faire, nous allons utiliser l'expérience et les outils acquis avec *C. diphtheriae*.

H2.3 Analyse temporelle des isolats de *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* en France

Nous envisageons de réaliser l'analyse temporelle des isolats obtenus au CNR. Dans un premier temps nous analyserons des isolats appartenant à l'espèce *diphtheriae* et, une fois que la technique de MLST sera standardisée pour l'espèce *ulcerans*, nous procéderons à celle des isolats de cette espèce. Les différentes analyses génétiques se feront avec le logiciel BioNumerics. Les isolats seront comparés en fonction de l'année et de leur site d'isolement, du prélèvement à partir duquel ils ont été isolés, de leur biovar, de la présence du gène *tox* dans leur matériel génétique. Le but est d'identifier d'éventuels clones spécifiques de région ou de pathologies.

H2.4 Séquençage du gène codant la toxine diphtérique

Une des questions importantes qu'il faut continuer à se poser est celle du polymorphisme de la toxine diphtérique. En effet, si la toxine se modifie cela pourrait entraîner une modification de l'efficacité du vaccin. Il est donc important de séquencer le gène *tox* de quelques isolats circulant en France pour déterminer s'ils sont homogènes et similaires aux gènes *tox* des souches de référence.

H2.5 Analyse des isolats porteurs du gène *tox* mais n'exprimant pas la toxine

Un pourcentage non négligeable d'isolats qui n'expriment pas la toxine porte le gène *tox*.

Une étude faite en Russie a révélé que l'incapacité de certains isolats à produire la toxine diphtérique était due soit à la suppression d'un nucléotide conduisant à la formation d'un codon stop, soit à la présence d'une séquence d'insertion (éléments IS) à l'intérieur du gène *tox* (Melnikov *et al*, 2004; Volozhantsev *et al*, 2004). Il nous semble important d'analyser pourquoi les isolats de cette catégorie circulant en France n'expriment pas la toxine. S'agit-il des mêmes mutations ? Des réversions sont-elles possibles ?

A plus long terme nous souhaitons, analyser les propriétés de ces isolats, en particulier ceux induisant la formation de pseudo-membranes chez les patients en comparaison avec les isolats exprimant la toxine, au niveau de leur adhésion aux cellules de l'hôte et de leur cytotoxicité.

H2.6 Analyse du gène *dtxR* des isolats ne portant pas le gène *tox*

Dans la littérature l'émergence d'isolats ne portant pas le gène *tox* a été quelquefois décrite dans les régions vaccinant la population avec une couverture élevée (Riegel *et al*, 1997; Reacher *et al*, 2000; Melnikov *et al*, 2004; De Zoysa *et al*, 2005; Zasada *et al*, 2005; Romney *et al*, 2006).

Une étude faite au Royaume-Uni a montré que chez ces isolats le gène *dtxR*, codant le récepteur du phage, est entièrement fonctionnel. En conséquence, si ces isolats sont lysogénisés par un bactériophage ils pourraient de nouveau exprimer la toxine. Il nous semble là aussi important de séquencer le gène *dtxR* des isolats non porteurs du gène *tox* actuellement en circulation en France et le comparer avec le gène *dtxR* des isolats exprimant la toxine.

Annexe 1 Class 1 Integron and Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole in a Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae mitis*

Class 1 Integron and Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole in a Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae mitis*

O. BARRAUD^{1,2}, E. BADELL-OCANDO³, F. DENIS^{1,2}, N. GUISO³, MC. PLOY^{1,2}

¹INSERM Equipe Avenir, ²Univ Limoges, EA3175, ³Institut Pasteur, National Centre of Reference of toxigenic corynebacteria, Paris, France.

Abstract

Background: Integrons are bacterial genetic elements able to capture and express antibiotic resistance gene cassettes. Multi-resistant integrons (MRI) are mainly described among Gram negative bacteria but rarely among Gram positive *Corynebacterium diphtheriae mitis* clinical isolate.
Methods: Toxigenic *C. diphtheriae mitis*, FRC24, was isolated from a cutaneous wound from a 9 months old child in Mayotte in 2008. S55, S56 and S57 were highly resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT). MICs for trimethoprim (TMP), sulfamethoxazole (SMX) and SXT were determined using a Tagman probe-based multiplex real-time PCR. Class 1 MRI cassette array was determined using PCR and sequencing.
Results: The genome of FRC24 harboured a class 1 MRI with a novel cassette array, *orfA16* conferring resistance to TMP (resistance to S55). FRC24 was highly resistant to TMP, S55 and SXT with MIC₅₀₋₅ >102.4 and 3.12 mg/L, respectively. MRI was framed by IS6100 disrupting the *intI1* integrate gene. The integrate is thus unable to integrate other cassettes.
Conclusions: This study identifies for the first time the presence of a class 1 MRI in the genome of a toxigenic *C. diphtheriae mitis* clinical isolate. The class 1 MRI was found to be unique among other *Corynebacterium* species, suggesting that this class 1 MRI was acquired *in situ* an insertion event. Further investigations concerning the genetic environment are undertaken.

Introduction

Integrons are bacterial genetic elements able to acquire and express genes embedded within cassettes [1]. They are defined by 3 key elements (Figure 1):
 • *intI1*, a gene coding an integrase able to catalyze cassettes integration and excision,
 • *attI1*, a recombination site recognized by *intI1*,
 • *Pc*, a promoter controlling expression of the cassette(s).



Figure 1. Integron organization.
 Pc: cassette promoter, attI1, attC1, attC2: recombination sites, intI1: integrate gene.

According to the amino-acid sequence of *intI1*, 3 main classes of Multi-Resistant Integrons (MRI) are defined. Class 1 MRI are the more prevalent; they often possess a "3' conserved segment" (3CS) downstream the cassette array with *qacEdelta1* gene, *suI1* gene and *orf5*.

MRI have been largely described in Gram-negative bacteria and are involved in the spread of antibiotic resistance.
 Few publications have retrieved integrons in Gram-positive bacteria. Only class 1 integrons were described in high GC% Gram-positive bacteria [2, 3], mainly among the *Corynebacterium* genus [4, 5].

We describe here a class 1 MRI conferring resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in a toxigenic *Corynebacterium diphtheriae mitis* clinical isolate.

Methods

Isolation of *Corynebacterium diphtheriae* FRC24 isolate
 FRC24 was isolated from a cutaneous wound from a 9 months-old child in Mayotte in 2008. Identification, toxin production and antibiotic susceptibility were performed by the National Centre of Reference of toxigenic corynebacteria (Pasteur Institute, Paris, France). FRC24 was a toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype *mitis* isolate with an unexpected resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT).
Resistance to Trimethoprim-sulfamethoxazole
 MICs for trimethoprim (TMP), sulfamethoxazole (SSS) and SXT were determined using E-test according to the manufacturer recommendations (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

Detection of integrons

Total DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Class 1, 2 and 3 MRI were detected using a Tagman[™] probe-based real-time PCR targeting the *intI1*, *intI2* and *intI3* genes [6].

Gene cassette array and genetic environment of the class 1 integron

For cassette content, we performed PCR mapping and sequencing as previously described [7]. Genetic environment of the integron was performed by inverse PCR.

Results (1)

Antibiotic susceptibility

FRC24 was highly resistant to SXT : MIC > 32 mg/L
 with a high resistance level to TMP : MIC > 32 mg/L
 and a high resistance level to SSS : MIC > 1024 mg/L.



Figure 2. Gene cassette array and genetic environment of the class 1 MRI harbored by *C. diphtheriae* FRC24.
 Pc: cassette promoter, attI1, attC1, attC2: recombination sites, *oriT*: deleted integrate gene, *qacEdelta1*, *suI1* and *orf5* compose the 3' conserved segment.

Results (2)

Detection of integrons
 Triplex PCR revealed presence of a class 1 MRI. No class 2 nor class 3 MRI were retrieved.
Gene cassette array (Figure 2)
 Sequencing revealed a novel cassette array with 2 cassette genes with complete *attC* sites:
 • *qacEdelta1* conferring resistance to TMP,
 • *orf5* conferring resistance to quaternary ammonium compounds.
 Both genes were expressed *in vitro* the PCW_{su10} promoter variant [8].
 Downstream the gene cassettes array, the 3'CS was complete including the *suI1* gene conferring resistance to SSS.

Genetic environment of the integron (Figure 3)

The MRI was framed by two copies of the insertion sequence IS6100 which at the left-end side disrupted the *intI1* gene.

Discussion (1)

Gene cassette array
 It is the first time that *qacH* and *orfA16* gene cassettes are found among the *Corynebacterium* genus. This novel cassette array *orfA16-qacH* was never previously described, even among Gram negative bacteria.

Resistance to SXT is concordant with the presence of *qacH* and *suI1* genes.
 High resistance level to TMP, conferred by *orfA16*, can be explained by presence of the PCW_{su10} promoter. This PC variant is a strong one, 15 fold-higher than the weak PCW variant [8]. Among the 8 class 1 MRI described in the Genebank in *Corynebacterium* sp, 3 contained the PCW_{su10} variant, 4 the PCW and 1 the PC_{H1} variant which strength is between PCW and PCW_{su10}.

Discussion (2)

Genetic environment of the integron

We found that the class 1 MRI is framed by IS6100.
 This IS was previously found associated with class 1 MRI in *Corynebacterium* [5, FN825254]. One can assume that IS6100 plays a role in the dissemination of integrons within the *Corynebacterium* genus and that subsequently the network cassette is modified by *intI1*-mediated recombination events.

In this MRI, the Δ *intI1* integrate is unable to integrate or excise cassettes leading to the stability of the gene cassette array.

Conclusion

This study describes, for the first time, the presence of a class 1 MRI in the genome of a toxigenic *C. diphtheriae* isolate containing the *orfA16* cassette and the *suI1* gene conferring resistance to SXT.

Further investigations concerning the genetic environment are undertaken.

References

- Mead D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Aug;4(8):699-30.
- Nandi S, Maharaj U, Hofberg C, Summers AO. Gram-positive bacteria as a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 4;101(18):7118-22.
- Agarzo Y, Saravang D. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from piglets and manured soil. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(7):2794-7.
- Agarzo Y, Maharaj U, Hofberg C, Summers AO. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 Dec 15;169(2):391-5.
- Tsuchi A, Gokker S, Puhler A, Kallinowski J, Thienbich G. The 27.8 kb R-plasmid pTE3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system *tet 33* flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS600. *Plasmid*. 2002 Sep;48(3):137-39.
- Agarzo Y, Maharaj U, Hofberg C, Summers AO. Multiple real-time PCRs for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Aug;65(8):1462-5.
- Ploy MC, Courainin P, Lambert T. Characterization of *intA0* of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmiA2* and *qacF*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Oct;42(10):2557-60.
- Jawe T, Da Re S, Denis F, Mirel D, Ploy MC. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000793>.