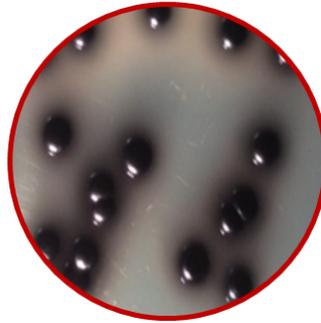


**CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES
CORYNÉBACTÉRIES DU COMPLEXE *diphtheriae***



BILAN DES ACTIVITÉS 2017-2021

Responsable : Sylvain BRISSE

Responsables adjoints : Edgar BADELL et Julie TOUBIANA

Unité Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes

Institut Pasteur



REMERCIEMENTS

Le CNR remercie les laboratoires de microbiologie et de biologie médicale qui ont envoyé des prélèvements ou échantillons à analyser, ainsi que leurs informations associées, rendant possible la surveillance de la diphtérie en France métropolitaine et d'Outre-Mer, en clinique humaine et vétérinaire.

Le CNR remercie également Mélanie Hennart, Virginie Passet, Annie Landier, Nathalie Armatys, Nora Zidane et Sébastien Bridel (Unité BEBP, Institut Pasteur) pour leur contribution à l'analyse des séquences génomiques et des antibiogrammes sur la période 2017-2022.

NOTE

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

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent rapport, faite sans l'autorisation écrite du CNR, est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées, tout en faisant clairement référence à ce présent rapport (E. Badell-Ocando, J. Toubiana & S. Brisse. 2022. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Corynébactéries du complexe *diphtheriae* – Bilan des activités 2017-2021. Institut Pasteur, Paris, France). Les données issues des tableaux et figures présentées dans ce rapport ne doivent pas être publiées sans l'accord explicite du CNR.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations et acronymes	5
1 Note de présentation et engagements.....	6
1.2 Présentation synthétique.....	7
1.3 Déclaration publique d'intérêt.....	8
2 Descriptifs des capacités du laboratoire.....	9
2.1 Organisation proposée pour répondre au cahier des charges	9
2.2 Les moyens du laboratoire affectés au CNR.....	9
2.3 Bref descriptif des thématiques de recherche dans le domaine d'expertise du CNR.....	13
2.4 Capacités techniques du laboratoire dans le domaine d'expertise du CNR	13
2.4.1 Liste des techniques pour le diagnostic/identification, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux /typageutilisées par le CNR.	13
2.4.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de références disponibles.....	14
3 Activités scientifiques et techniques (2017-2021)	15
3.1 Expertise.....	15
3.1.1 Échantillons biologiques étudiés.....	15
3.1.2 Sensibilité aux antibiotiques.....	16
3.1.3 Évolutions des techniques : qPCR.	16
3.1.4 Évolutions des techniques : Séquençage et méthodes de génotypage.	16
3.1.5 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	17
3.1.6 Participation aux comparaisons inter-laboratoires (CIL).....	17
3.1.7 Collection de matériel biologique	17
3.1.8 Envoi de souches.....	17
3.2 Travaux de recherche appliquée en lien avec les missions du CNR	18
3.2.1 Études taxonomiques : description des nouvelles espèces <i>Corynebacterium belfantii</i> et <i>Corynebacterium rouxii</i>	18
3.2.2 Structure des populations de <i>C. diphtheriae</i> et caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques : découverte d'un gène de résistance à la pénicilline.....	18
3.2.3 Épidémiologie globale et taxonomie génomique des souches de <i>C. diphtheriae</i>	18
3.2.4 Étude microbiologique de portage à <i>C. diphtheriae</i> chez des patients atteints de mucoviscidose.....	19
3.2.5 Analyse de cas et descriptions cliniques ponctuelles.....	19
3.2.6 Participation à une étude européenne de séro-épidémiologie.....	19
3.2.7 Étude de l'épidémie de diphtérie au Yémen, période 2017-2020	20
3.2.8 Analyse du portage de corynébactéries par les animaux de compagnie	20
3.2.9 Recherche de corynébactéries appartenant au complexe <i>diphtheriae</i> dans la faune sauvage	21
3.2.10 Collaboration avec Cerba-Vet : infections à <i>C. diphtheriae</i> ou <i>C. ulcerans</i> chez l'animal de compagnie.....	21
3.3 Conseil aux professionnels ou aux autorités de santé, et enseignements.....	22
3.4 Contribution à la surveillance épidémiologique.....	23
3.4.1 Réseaux et collaborations	23
3.4.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections : Tendance temporelle	24
3.4.3 Origines géographiques des isolats	25
3.4.4 Autres espèces : <i>C. pseudotuberculosis</i> , <i>C. rouxii</i> et <i>C. belfantii</i>	26
3.4.5 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	27
3.4.6 Apport de la génomique à la surveillance chez <i>C. diphtheriae</i>	30

3.5 Contribution à l'alerte-----	33
4 Liste des publications et communications-----	34
4.1 Communications nationales -----	36
4.2 Communications internationales -----	36
4.3 Conférences sur invitations-----	36
4.4 Partenariats ou collaborations avec des structures ou instances nationales ou internationales (en santé animale ou environnementale, OMS, ECDC, -----	36
5 Description des démarches qualité mises en œuvre au sein du CNR-----	37
5.1 Démarche qualité du laboratoire -----	37
5.2 Reconnaissance du laboratoire par des instances nationales ou internationales-----	37
5.3 Gestion de la confidentialité -----	37
6 Description de l'infrastructure informatique-----	38
6.1 Capacité à mettre en œuvre la transmission régulière et automatisée de données vers Santé Publique France. -----	38
6.2 Procédures visant au respect de la conformité à la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractères personnel ou les évolutions prévues. -----	38
7 Proposition de programme de travail quinquennal pour la période 2023-2027 -----	39
7.1 Activités d'expertise -----	39
7.1.1 Réseaux de partenaires (cliniciens, laboratoires de biologie médicale) au niveau national, incluant les outre-mer et collaborations à constituer ou renforcer -----	39
7.1.2 Techniques de détection, d'identification et de caractérisation en développement ou dont le développement est prévu -----	39
7.2 Travaux de recherche appliqués envisagés en lien avec les missions du CNR-----	40
7.2.1 <i>Caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques et développement de seuils critiques</i> -----	40
7.2.2 <i>Diversité génomique des isolats de C. ulcerans</i> -----	40
7.2.3 <i>Infections à C. diphtheriae ou C. ulcerans chez l'animal de compagnie</i> -----	40
7.2.4 <i>Dynamique évolutive des prophages portant le gène tox</i> -----	40
7.2.5 <i>Etudes de l'épidémiologie moléculaire de la diphtérie en Nouvelle-Calédonie, La Réunion et en Guyane Française</i> -----	41
7.2.6 <i>Microbiologie des biovars de C. diphtheriae et C. pseudotuberculosis et liens avec les données cliniques</i> -----	41
7.3 Possibilité de montée en charge des capacités pour répondre à une situation sanitaire exceptionnelle et les modalités effectives de mise en œuvre (réorganisation, transfert de ressources, mobilisation de partenaires...)------	41
7.4 Activités de conseil, formation et information -----	41
7.5 Contribution à la surveillance épidémiologique -----	42
7.6 Contribution à l'alerte-----	43
ANNEXE 1 : PROCESSUS QUALITE -----	44
ANNEXE 2 : ORGANISATION DES CNR A L'INSTITUT PASTEUR-----	45
DOCUMENT SUPPLEMENTAIRE : Gestion des conflits d'intérêt -----	48

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviations & Acronymes	Dénomination
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARS	Agence Régionale de Santé
CAT	Conduit à tenir lors de l'apparition d'un cas de diphtérie
cgMLST	Core Genome Multi-Locus Sequence Typing
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CIL	Comparaison inter-laboratoires
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNR	Centre National de Référence des Corynébactéries du complexe <i>diphtheriae</i>
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
DGS	Direction Générale de la Santé
ECDC	European Center for Diseases Control
HCSP	Haut Comité de Santé Publique
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
qPCR	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (ou quantitative)
MLST	Multilocus Sequence Typing
NTTB	Non-toxigenic, <i>tox</i> gene-bearing (souches portant le gène, mais n'exprimant pas la toxine diphtérique)
SPF	Santé Publique France
<i>tox</i>	Gène qui code la toxine diphtérique
<i>tox+</i>	Isolat porteur du gène <i>tox</i> dans son génome
<i>tox-</i>	Isolat non porteur du gène <i>tox</i> dans son génome
WGS	Whole Genome Sequencing = Séquençage du génome entier

1 NOTE DE PRESENTATION ET ENGAGEMENTS

1.1 Courrier officiel d'acte de candidature



Centre National de Référence des Corynébactéries du complexe *diphtheriae*

Paris, le 1^{er} juin 2022

Réponse à l'AAC CNR 2023
Santé Publique France
Direction des maladies infectieuses

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

J'ai l'honneur de faire acte de candidature pour le CNR Corynebactéries du complexe *diphtheriae*. Ce groupe taxonomique comprend les espèces *Corynebacterium diphtheriae* et *C. ulcerans*, deux pathogènes qui produisent souvent la toxine diphtérique, et quatre autres espèces plus rares et majoritairement toxine-négatives.

Je m'appuierai pour assurer les missions du CNR, sur l'équipe du mandat précédent, ce qui assurera la continuité de l'expertise microbiologique. De plus, cette équipe sera renforcée d'un poste technique supplémentaire pour faire face à l'augmentation constante des analyses depuis 20 ans. L'équipe du CNR comprendra toujours Julie Toubiana, infectiologue pédiatre, qui apportera une valence médicale précieuse pour nos activités de conseil et interactions avec les cliniciens. La continuité de cette activité de conseil sera assurée avec en outre l'arrivée d'un référent suppléant hors CNR : le Prof. Pierre Tattevin, infectiologue au CHU Pontchaillou de Rennes. Les activités de surveillance s'appuieront sur les réseaux de biologistes français, en métropole et Outre-Mer, et dans le domaine vétérinaire. Notre expertise continuera à être mise à disposition des autorités comme cela a été fait lors du mandat précédent (complément à la Conduite à Tenir, recommandations sur l'utilisation de l'antitoxine).

Comme pour les autres CNR de l'Institut Pasteur, notre CNR bénéficiera des ressources support de l'Institut Pasteur détaillées en Annexe. Le système de management de la qualité et l'accréditation ISO15189 pour le diagnostic moléculaire de la diphtérie seront maintenues. Par ailleurs, les applications du séquençage génomique seront développées en particulier dans le domaine de la surveillance épidémiologique de *C. ulcerans* afin de mieux comprendre la transmission entre les animaux et l'homme.

L'amélioration des outils de diagnostic biologique sera également un objectif important, car il n'existe actuellement aucun test de diagnostic rapide de la diphtérie à l'échelle internationale. Nous travaillons également avec l'EUCAST pour la redéfinition des seuils critiques de sensibilité aux antibiotiques pertinents en clinique.

C'est donc dans un projet en continuité et très intégré, combinant expertise microbiologique et développements méthodologiques, surveillance épidémiologique, clinique, et études de l'interface humain-animal, que s'inscrit notre candidature au CNR pour la période 2023-2027.

Dans l'espoir que cette candidature sera retenue,

Bien cordialement,


Sylvain Brisse

1.2 PRESENTATION SYNTHETIQUE

La diphtérie est une maladie infectieuse contagieuse, potentiellement mortelle, causée par les souches toxigènes des espèces bactériennes *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) et *C. ulcerans*. Cette dernière est un pathogène zoonotique qui est transmis à l'homme par certains animaux domestiques comme les chiens et chats. Dans la mesure où certaines souches d'une troisième espèce de corynébactéries, *C. pseudotuberculosis*, peuvent également produire la toxine et causer des symptômes diphtériques, on regroupe cette espèce avec les deux agents majeurs de la diphtérie dans le « complexe diphtheriae ». Ce complexe comprend trois autres espèces récemment décrites mais non toxigènes (*C. silvaticum*, *C. rouxii*, *C. belfantii*) et forme une branche phylogénétique individualisée au sein du genre *Corynebacterium*. La toxine diphtérique, identifiée par Yersin et Roux dès 1888, est responsable des symptômes systémiques de la diphtérie et est portée par un phage qui peut infecter certaines souches de corynébactéries du complexe diphtheriae et s'intégrer dans leur chromosome, rendant les souches lysogénisées capables de produire la toxine.

La diphtérie est une maladie à prévention vaccinale depuis les années 1930. Le vaccin consiste en une forme modifiée inactivée mais immunogène de la toxine, appelée anatoxine. La couverture vaccinale élevée surtout chez les enfants (98%) a permis un contrôle quasi-total de la maladie. Très peu de cas autochtones sont déclarés en France métropolitaine depuis les années 1980, contre 45 000 cas à la fin des années 1940.

Toutefois, depuis deux décennies, le nombre d'analyses de souches et échantillons envoyés au CNR a très nettement augmenté, passant de 22 souches (dont deux toxigènes) seulement de 2002 à 2004, à 443 lors du mandat 2011-2016, et à 869 durant le dernier mandat (2017-2021). D'autre part, des cas importés d'infection à *C. diphtheriae* sont rapportés régulièrement en France et en Europe (451 cas de diphtérie ont été reportés par l'OMS en Région Europe entre 2010 et 2019). Les déplacements de populations liés à la guerre en Ukraine pourraient entraîner une augmentation considérable des cas, dans un contexte où la couverture vaccinale chez les adultes en France et en Europe est par ailleurs largement insuffisante (Berbers *et al.*, Nature Communications, 2021).

En plus de la diphtérie classique causée par *C. diphtheriae*, nous observons une nette augmentation de cas autochtones causés par *C. ulcerans*. Ces cas, toujours transmis par les animaux (en particulier, chats et chiens), ont entraîné une redéfinition de l'étiologie de la diphtérie et justifié en Europe l'extension de la déclaration obligatoire aux infections dues à *C. ulcerans*. Entre 2017 et 2021, des souches de *C. ulcerans* toxigènes ont été identifiées par le CNR dans 42 cas cliniques humains et dans 156 prélèvements vétérinaires. Des décès ont été enregistrés en France après des infections à *C. ulcerans*, chez des personnes âgées possédant des animaux de compagnie. Cette émergence rend cruciale la surveillance de cette espèce bactérienne en parallèle à la surveillance de *C. diphtheriae*, et pose des défis particuliers en termes de contrôle du fait de son caractère zoonotique lié aux animaux de compagnie. Cette évolution de l'épidémiologie a amené le HCSP à émettre en 2021 un complément à la conduite à tenir de 2011, auquel le CNR a contribué.

Par ailleurs, même si l'antibiothérapie de première intention (amoxicilline) reste efficace, il existe des souches multi-résistantes aux anti-infectieux, y compris aux macrolides utilisés en seconde intention. Enfin les stocks d'antisérums antidiphtérique (antitoxine) respectant les standards de production n'étant plus renouvelés, la faible disponibilité de ce traitement critique en cas de syndrome toxinique a amené le HCSP à restreindre ses conditions d'utilisation.

Face aux évolutions de l'étiologie, des moyens de contrôle et de l'épidémiologie de la diphtérie, il est fondamental de maintenir une expertise multidisciplinaire de cette infection historiquement ravageuse. Mieux surveiller la circulation des souches entre les zones d'endémie (dont font partie certains territoires ultramarins ou de l'Est de l'Europe) et les zones à forte couverture vaccinale, et le rôle du portage animal dans le cas de *C. ulcerans*, apportera des informations précieuses pour contrôler la transmission de la diphtérie et orienter les politiques de contrôle. De plus, il est nécessaire non seulement de maintenir, mais aussi de développer l'expertise microbiologique de diagnostic, identification et de génotypage des souches, celle de la dynamique du phage portant la toxine, et celle des éléments génétiques de résistance aux antibiotiques.

Le Centre National de Référence (CNR) des Corynébactéries du complexe *diphtheriae*, rattaché à l'Unité « Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes » (BEBP) de l'Institut Pasteur, a développé une expertise microbiologique, épidémiologique et clinique sur la diphtérie depuis 2008. Son activité dans le domaine est internationalement reconnue. Il opère sous assurance qualité, et sous accréditation ISO15189 pour la détection du gène de la toxine diphtérique et l'identification des espèces appartenant au complexe diphtheriae.

L'équipe du CNR présente sa candidature pour le mandat 2023-2027 sur la base de cette riche expertise et de projets qui prolongent ses activités du mandat précédent.

1.3 DECLARATION PUBLIQUE D'INTERET

La déclaration publique d'intérêt de Sylvain Brisse a été mise à jour sur le site de Santé Publique France le 16 mai 2022 et est consultable sur le site <https://dpi.sante.gouv.fr/> . Les seuls liens d'intérêt sont présentés ci-dessous.

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

2.3.1 Participation à des essais et études

EUROPEAN CDC, STOCKHOLM

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

Type d'étude : Etude multicentrique

Votre rôle : Co-investigateur

Rémunération : aucune

Période : 01/05/2016 à aujourd'hui

2.3.2 Autres travaux scientifiques

INSTITUT PASTEUR

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

Rémunération : À l'organisme (Institut Pasteur)

Montant perçu (Organisme) : Je ne sais pas

Période : 01/2011 à aujourd'hui

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

2 DESCRIPTIFS DES CAPACITES DU LABORATOIRE

2.1 ORGANISATION PROPOSEE POUR REpondre AU CAHIER DES CHARGES

L'unité BEBP de l'Institut Pasteur assurera seule les exigences prévues au cahier des charges du Centre National de Référence des Corynébactéries du complexe diphtheriae, estimant que la présence d'un laboratoire associé n'est pas nécessaire. L'activité de conseil clinique s'appuiera en outre sur la participation en tant que référent externe de Prof Pierre Tattevin, infectiologue au CHU Pontchaillou de Rennes.

Nous maintiendrons et poursuivrons notre interaction étroite avec Santé Publique France, et continuerons nos interactions avec nos collègues français, européens et internationaux en référence et surveillance de la diphtérie.

2.2 LES MOYENS DU LABORATOIRE AFFECTES AU CNR

1.1.1. En matière de ressources humaines

- Le Directeur du CNR, Sylvain BRISSE, est aussi le Directeur de l'unité BEBP.
- Edgar BADELL sera, comme lors du précédent mandat du CNR, responsable adjoint et référent pour les questions microbiologiques.
- Julie TOUBIANA sera, comme lors du précédent mandat du CNR, responsable adjointe et référente pour les questions cliniques.
- Annick CARMI-LEROY, technicienne du CNR, apportera son savoir-faire technique acquis lors du mandat précédent ; elle sera remplacée (départ à la retraite) durant le mandat.
- Sylvie BREMONT, nouvelle technicienne du CNR, apportera son savoir-faire technique pour renforcer le CNR, et assurera la continuité avant le départ de Mme CARMI-LEROY
- Virginie PASSET, technicienne formée à la bioanalyse, sera affectée à la surveillance génomique
- Isabelle MOULHERAT, assistante, contribuera à l'administration du CNR, à son système documentaire dans le cadre du système de management de la qualité, et aux échanges avec nos correspondants.

La participation des membres en poste lors du mandat précédent du CNR, assurera la continuité de l'expertise microbiologique et clinique. Par rapport au mandat précédent, l'équipe est renforcée d'une part, d'un poste technique pour faire face à l'augmentation des volumes d'analyse, et d'autre part, d'un temps partiel pour les analyses de surveillance génomique.

Le CNR sera renforcé sur sa mission de conseil par Prof Pierre TATTEVIN, infectiologue au CHU Pontchaillou de Rennes, qui assistera le CNR en tant que référent clinique externe.

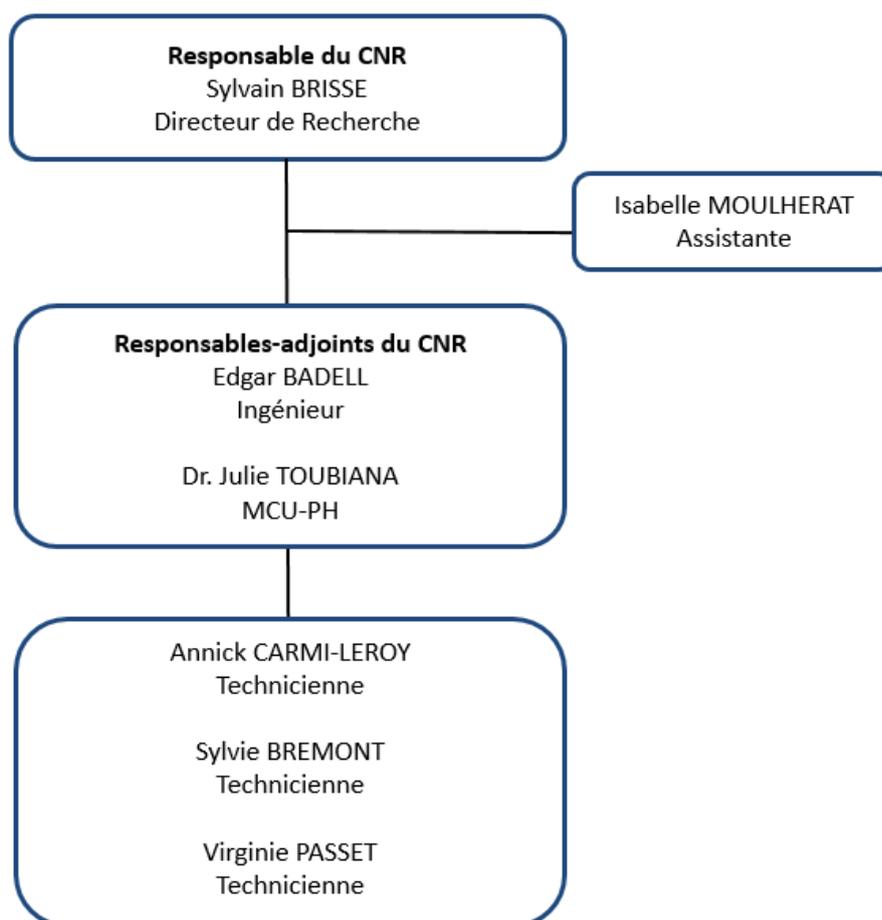
2. Curriculum du responsable scientifique

Cette partie a été supprimée du rapport public

2.1.1. État des emplois rémunérés pour assurer le fonctionnement du CNR

Cette partie a été supprimée du rapport public

2.1.2. Organigramme du CNR de la diphtérie



2.1.3. En matière d'équipements et de logistique

Locaux de l'unité BEBP et du CNR

L'unité occupe une surface d'environ 150 m². La distribution de pièces dans lesquelles l'activité du CNR est réalisée est détaillée dans le tableau ci-dessous :

Locaux de l'unité	Surface
Bureaux (N=5)	41 m ²
L1	17 m ²
L2+	26 m ² (accès avec badge)
L2 (préparation des « mix PCR »)	9 m ²
L1	33 m ²
Locaux communs partagés avec d'autres entités	
L2 (pièce pour réception des produits biologiques)	12 m ² (accès avec badge)
Pièce technique (congélateurs -20°C et -80°C)	12 m ²
Salle de réunion	17 m ²
Pièce de pesées et stockage des produits chimiques	10 m ²
Ilot à déchets	8 m ² (accès avec badge)
Pièce vestiaires	4 m ²
Chambre froide +5°C	9 m ²
L2+ Local partagé avec l'unité de Biologie des Spirochètes et l'unité d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques	26 m ² (accès avec badge) Ce local est à disposition du CNR pour être utilisé si le L2+ du CNR n'est pas disponible
2 Pièces techniques (accès avec badge) : Dans chacune il y a 1 Congélateur -80°C qui contient la collection de souches du CNR	

Principaux équipements du laboratoire

- Thermocycleur en temps réel LC480
- Thermocycleur en temps réel RotorGene-Q
- Thermocycleurs à point final
- Autoclaves
- 5 postes de sécurité microbiologique
- Étuves
- Microscope à fluorescence
- Congélateurs à -80° et à -20°C
- Incubateurs à agitation orbitale
- Centrifugeuses
- Balances de précision
- Spectrophotomètres pour acides nucléiques (1 Qubit / 1 Nanodrop)
- Spectrophotomètres pour les cultures bactériennes
- 1 Système Mc1K de Oxford Nanopore Technologies

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

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

Les thématiques de recherche de l'unité dans le domaine d'expertise du CNR couvrent la biodiversité phénotypique et génomique des espèces du complexe *diphtheriae*, la dynamique évolutive des éléments génétiques mobiles toxigènes, et les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques. Les applications découlant directement de ces recherches incluent le développement de méthodes de typage génomique et le diagnostic moléculaire.

Nos recherches sont décrites plus en détail ci-dessous, et sur le site web de l'unité BEBP : <https://research.pasteur.fr/fr/team/biodiversity-and-epidemiology-of-bacterial-pathogens/>

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

2.4.1 Liste des techniques pour le diagnostic/identification, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux /typageutilisées par le CNR.

L'expertise du CNR comprend :

- La microbiologie des bactéries du complexe *diphtheriae* ;
- La détection et l'identification moléculaire des différentes espèces ;
- La détection de l'expression de la toxine
- La sensibilité aux antibiotiques
- Le typage génomique des souches et leur émergence épidémiologique et évolution génétique

Plus spécifiquement :

Pour tout isolat envoyé ou obtenu au CNR nous recherchons en priorité la **présence du gène *tox* ainsi que des variants du gène *rpoB*** qui permettent d'identifier les espèces. Cette recherche de première intention se fait par PCR multiplexée en temps réel et permet un rendu de résultat en quelques heures, accompagné d'alerte des autorités sanitaires en cas de détection du gène de la toxine diphtérique.

Nous vérifions l'**expression de la toxine** à l'aide du test Elek, qui est un test d'immuno-précipitation dans un milieu gélosé.

Pour l'isolement des bactéries du complexe *diphtheriae* nous réalisons la **culture sur un milieu sélectif, le milieu de Tinsdale** fabriqué à la plateforme de préparation de milieux de l'Institut Pasteur.

Nous complétons l'identification par des **techniques de microbiologie** telles que : **coloration de Gram, galerie API Coryne, test biochimiques** (biotypage) et **spectrométrie de masse MALDI-TOF**.

La sensibilité aux antibiotiques est testée par diffusion en gélose et, lorsqu'une résistance (ou sensibilité intermédiaire) est détectée, nous déterminons les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par Etest. Les interprétations suivent les recommandations 2020 de la Société Française de Microbiologie. Nous collaborons avec l'EUCAST pour la définition des seuils critiques.

En parallèle, nous réalisons le **typage moléculaire des isolats**, comprenant la technique multilocus sequence typing à l'échelle du génome (cgMLST), l'analyse de séquence du gène *tox* et des gènes de biovar (*spuA*), et la recherche de déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques.

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

○ Description : nombre de souches, caractérisation

Notre collection regroupe plus de 1000 isolats reçus au CNR entre 2000 et 2021. L'ensemble de ces isolats a été caractérisé pour le biotype, la présence du gène *tox* et son expression. De plus, la majorité des isolats a été typée par séquençage génomique, qui permet d'identifier les éventuelles mutations du gène *tox* et son contexte génomique, des gènes marqueurs d'espèce et de biovar, les gènes MLST, et les gènes de résistance aux antibiotiques.

○ Conditions de stockage

Les isolats sont conservés à -80°C en double, en utilisant deux congélateurs différents, chacun branché sur une ligne électrique indépendante et sous surveillance électronique 24h/24h avec système d'alarme.

○ Conditions de mise à disposition de ces collections

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

○ Bases de données de séquences et taxonomies génomiques des souches

L'unité de recherche, qui héberge le CNR, séquence systématiquement le génome des souches. Afin d'harmoniser et de faciliter l'analyse, l'unité de recherche hébergeant le CNR a développé une nomenclature génomique des souches (Guglielmini *et al.*, 2021, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34524891/>), et héberge une librairie génomique de *C. diphtheriae* qui regroupe toutes les séquences produites et partagées à l'échelle internationale. L'unité assure également la curation de la librairie génomique et des nomenclatures des souches de *C. ulcerans* et *C. diphtheriae* (MLST, lignées clonales et génotypes fins par cgMLST).

Le CNR maintient cette base de données afin de rendre accessible en ligne publiquement les séquences alléliques des gènes MLST et cgMLST ainsi que les profils alléliques des souches. Cela permet le partage d'une nomenclature des lignées phylogénétiques et groupes clonaux à l'échelle internationale, sur le même modèle que les nomenclatures déjà développées, par exemple, pour *Klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* (<http://bigsd.b.pasteur.fr>).

Les séquences génomiques des isolats du CNR sont mises à disposition de la communauté scientifique à l'occasion de la publication des études correspondantes, ou en temps réel dans le cadre de la surveillance et de collaborations nationales ou internationales.

3 ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES (2017-2021)

Nos activités scientifiques et techniques comprennent l'expertise, le conseil, la surveillance et l'alerte. Ces activités correspondent à nos missions de santé publique, et bénéficient de nos activités de recherche, elles-mêmes en lien direct avec les activités du CNR. Nos recherches portent principalement sur l'épidémiologie, le diagnostic, la clinique, l'évolution, l'antibiorésistance et la pathogénicité des corynébactéries du complexe *diphtheriae*.

3.1 EXPERTISE

3.1.1 Échantillons biologiques étudiés

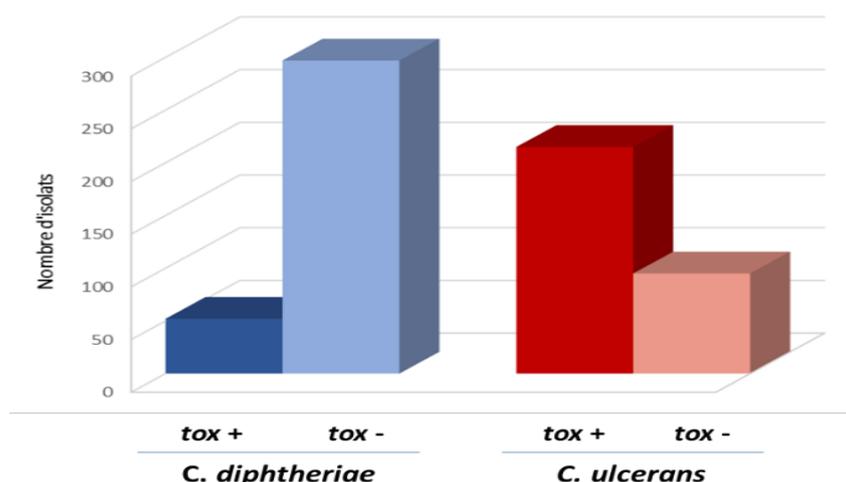
Le CNR analyse majoritairement des isolats provenant des microbiologistes de France métropolitaine, des microbiologistes de Mayotte, La Réunion, Guyane et Nouvelle-Calédonie, et des microbiologistes vétérinaires en métropole. Plus rarement, le CNR accepte des prélèvements biologiques (expectorations, prélèvements nasaux, sérums, prélèvements cutanés, pus, membranes).

Sur la période 2017-2021, nous avons reçu 825 échantillons ou souches à analyser. Ces échantillons incluaient :

- Des souches pour lesquelles nous avons recherché le gène *tox*, identifié l'espèce, vérifié la pureté, et que nous avons purifiées si les cultures reçues étaient poly-microbiennes.
- Des prélèvements (tissus ou écouvillons) que nous avons mis en culture et/ou sur lesquels une PCR diagnostique a été réalisée.

En outre, des souches ont été analysées dans le cadre de comparaisons inter-laboratoires (CIL) pour le maintien de l'accréditation ISO 15189.

Figure : Nombre total d'isolats cliniques reçus entre 2017 et 2021



Au total, 90 échantillons ont été négatifs, aucune bactérie appartenant au complexe *diphtheriae* n'ayant pu être isolée. Une partie de ces 90 échantillons correspondait à des identifications erronées réalisées par les laboratoires de biologie médicale et hospitaliers. Une autre partie correspondait à des échantillons qui ont été adressés au CNR en raison de symptômes cliniques suggestifs d'une angine diphtérique. Le reste des échantillons négatifs correspondait à des échantillons prélevés lors des enquêtes épidémiologiques autour des cas pour lesquels un isolat *tox+* avait été isolé.

Vingt-neuf échantillons correspondaient à des sérums (N= 5) et des souches pour des CIL (N=24).

A partir des 706 échantillons restants, 706 isolats ont été isolés ou confirmés. Ces isolats comprenaient 52 *C. diphtheriae* et 198 *C. ulcerans* porteurs du gène *tox* (*tox+*), ainsi que 288 *C. diphtheriae* et 78 *C. ulcerans* qui ne portaient pas le gène *tox* dans leur génome (**Figure**).

Il est important de noter que contrairement aux isolats de *C. diphtheriae*, les isolats de *C. ulcerans* sont majoritairement *tox+*.

En outre, 6 *C. pseudotuberculosis*, 63 *C. belfantii* et 21 *C. rouxii* ont été confirmés. Aucun de ces isolats ne portaient le gène *tox*.

3.1.2 Sensibilité aux antibiotiques

Le CNR surveille en particulier la sensibilité des souches à la pénicilline et l'amoxicilline (utilisées en routine) et à l'érythromycine (utilisée en cas d'allergie à la pénicilline). D'autres antibiotiques qui peuvent être pertinents dans certains contextes cliniques, sont également testés.

Les corynébactéries appartenant au complexe *diphtheriae* reçues ou isolées au CNR sont testées systématiquement par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Si une diminution de la sensibilité au-delà du diamètre critique est mise en évidence, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode des bandelettes à gradient (Etest).

Pour l'interprétation, nous nous basons actuellement sur les seuils de sensibilité des corynébactéries publiés en 2013 et 2020 par le CA-SFM, modifiés par nous suite à l'observation de la distribution naturelle des diamètres (méthode des ECOFFs) (Hennart et al., 2020 ; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33246485/>).

Tous les isolats ont été testés sur la période 2017-2021 pour leur sensibilité aux anti-infectieux, hormis quelques isolats animaux faisant partie d'épidémies. Les résultats sont donnés dans la partie surveillance.

3.1.3 Évolutions des techniques : qPCR.

Nous avons développé, évalué et validé une méthode de PCR multiplex en temps réel pour l'identification des corynébactéries du complexe *diphtheriae* et la détection du gène *tox*. Une version antérieure de cette méthode a été publiée en 2016 par une équipe de Public Health England (De Zoysa et al. J. Med. Microbiol. 2016). Nous avons ajouté dans cette multiplex, une cible (16S rRNA universel) servant de contrôle interne d'amplification et de présence d'ADN bactérien. Nous avons défini la limite de détection, la robustesse, la répétabilité, la reproductibilité et l'exactitude de cette qPCR. La méthode a été validée sur isolats et échantillons cliniques (écouvillons et tissus), et sur deux thermocycleurs différents (RotorGene-Q, Qiagen ; et LC480, Roche) et dans deux laboratoires (Institut Pasteur et PHE).

La technique permet un gain de temps (d'à peu près 3h) par rapport à la PCR en point final utilisée jusqu'en 2019.

Un dossier de validation de la méthode a été réalisé et l'accréditation obtenue auprès du COFRAC. Une publication a été réalisée (Badell et al., J. Med Microbiol., 2019 ; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31478826/>).

La méthode est utilisée en première intention au CNR depuis juillet 2019.

3.1.4 Évolutions des techniques : Séquençage et méthodes de génotypage.

En 2016-2017, nous avons mis au point le séquençage génomique pour les corynébactéries du complexe *diphtheriae*. Nous avons adapté la méthode d'extraction de l'ADN et la quantité de culture utilisée. Nous séquençons désormais systématiquement le génome des isolats du CNR par technologie Illumina. Cela permet de préciser l'espèce, d'analyser la variation (incluant des inactivations) du gène *tox*, et son contexte génomique (phage toxinogène). Les séquences génomiques sont aussi utilisées pour le typage moléculaire multilocus sequence typing (MLST), core genome MLST (cgMLST) ainsi que la détection des gènes de résistance aux antibiotiques.

En plus du séquençage Illumina, un séquençage de troisième génération (Oxford Nanopore Technologies ou Pacific Biosciences) est parfois réalisé afin de définir les plasmides ou autres éléments génétiques portant des gènes de résistance, et le contexte génétique du gène *tox* et du phage toxigène.

Une méthode cgMLST a été développée par l'unité hébergeant le CNR pour le typage fin des souches. Nous déterminons également la présence des gènes *tox* et *pld* (gène de la phospholipase D, impliquée dans la virulence des isolats appartenant aux espèces *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*). Les gènes de résistance sont extraits en utilisant BLAST à partir d'une combinaison de bases de données sources (ResFinder, CARD, ArgAnnot, NCBI-AMRFinderPlus).

Nos méthodes de génotypage MLST et cgMLST nous permettent de connaître si certaines souches sont reliées épidémiologiquement et de définir les lignées phylogénétiques auxquelles elles appartiennent (Guglielmini *et al.*, 2021, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34524891/>). Cela a été utile par exemple pour investiguer des cas d'infections en Guyane française ou en métropole.

Pour *C. ulcerans*, il n'existe pas de système cgMLST standardisé : nous analysons pour l'instant les séquences par des approches de comparaison de K-mers (JolyTree) et mutations ponctuelles à l'échelle du génome (SNP mapping).

A l'occasion de publications, les séquences brutes sont déposées au format fastq dans SRA ou ENA, et les assemblages sont déposés dans GenBank ou ENA et également rendus publics sur notre plateforme BIGSdb. A noter, la base pubMLST (Université d'Oxford) dans laquelle nous curions les données MLST, a été absorbée en 2022 dans notre plateforme de génotypage BIGSdb-Pasteur, en accord avec les administrateurs du site pubMLST.

3.1.5 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNR transmet sur demande ses protocoles pour l'isolement des corynébactéries, la détection du gène *tox* et l'identification moléculaire des corynébactéries du complexe *diphtheriae*. Le protocole d'isolement pour les criblages de suivi des contacts est disponible sur le site internet du CNR. Nos méthodes de génotypage des séquences génomiques sont intégrées à la plateforme BIGSdb-Pasteur et sont accessibles publiquement.

3.1.6 Participation aux comparaisons inter-laboratoires (CIL)

Le CNR participe à, ou réalise chaque année, des CIL pour la détection du gène *tox* et l'identification des isolats appartenant au complexe *diphtheriae*. Ces CIL étaient précédemment organisés par l'European Diphtheria Surveillance Network (EDSN) coordonné par l'ECDC, mais ce réseau n'est plus opérationnel.

Le CNR réalise maintenant les CIL nécessaires à son accréditation, grâce à une collaboration avec : i) Public Health England (UKSHA, Microbiology Reference Services, Colindale, Londres) ; et ii) Le Laboratoire de Microbiologie à l'Université Libre de Bruxelles.

Ces CIL ont été passés avec succès par le CNR, chaque année entre 2017 et 2021.

3.1.7 Collection de matériel biologique

Notre collection s'est enrichie de 700 nouveaux isolats, provenant essentiellement des laboratoires hospitaliers de France métropolitaine, ou de Mayotte, La Réunion, Nouvelle-Calédonie et Guyane ; ainsi que des laboratoires vétérinaires de métropole.

3.1.8 Envoi de souches

Dans le cadre des CIL que nous avons organisés entre 2017 et 2021, nous avons envoyé 48 souches à différents laboratoires : Public Health England, Microbiology Reference Services, Colindale, Londres ; Laboratoire de Microbiologie à l'Université Libre de Bruxelles ; National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene Department of Bacteriology and Biocontamination Control à Varsovie. En 2020 et 2021, six souches ont été envoyées au Laboratoire de Microbiologie à l'Université Libre de Bruxelles, avec lequel nous réalisons maintenant chaque année des essais inter-laboratoire réciproques.

3.2 TRAVAUX DE RECHERCHE APPLIQUEE EN LIEN AVEC LES MISSIONS DU CNR

3.2.1 Études taxonomiques : description des nouvelles espèces *Corynebacterium belfantii* et *Corynebacterium rouxii*

Jusqu'à récemment, la taxonomie du complexe *diphtheriae* était ancienne, la dernière description d'espèce (*C. ulcerans*, par Philippe Riegel et collègues) datant de 1995. Notre analyse de la diversité génétique des souches du CNR a révélé l'existence de lignées phylogénétiques distinctes jusqu'à présent identifiées à *C. diphtheriae*. L'une d'elle correspondait à une identité génomique moyenne (ANI) à la souche type de *C. diphtheriae* 95% à peu près. Elle correspond à la majorité des souches de biotype Belfanti de notre collection, et est différenciée par l'absence de fermentation du glycogène et de réduction du nitrate. Nous avons proposé le nom *C. belfantii* pour ce groupe (Dazas et al., IJSEM 2018 ; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30355399/>), le démarquant ainsi de *C. diphtheriae* dans la taxonomie bactérienne. Aucune souche de cette nouvelle espèce n'est toxigène, ce qui souligne l'intérêt de la distinguer de *C. diphtheriae*.

Une seconde lignée distincte a été découverte et décrite comme *C. rouxii* en 2020 par le CNR. Cette espèce est rare, comprenant actuellement un peu plus de 10 souches répertoriées ; et aucune ne porte le gène *tox*. Elles sont également de biovar Belfanti (Badell et al., Res Microbiol., 2020 ; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119905/>).

Ces deux espèces nouvelles ne sont pas distinguées de *C. diphtheriae* par la qPCR multiplex utilisée au CNR, et sont identifiées en première intention comme *C. diphtheriae*. Le MALDI-ToF permet de distinguer *C. rouxii* au CNR, mais les bases de données commerciales ne sont pas encore en mesure de faire cette distinction car aucun spectre de référence n'y a été inclus.

3.2.2 Structure des populations de *C. diphtheriae* et caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques : découverte d'un gène de résistance à la pénicilline

Sur la base de 247 souches collectées en France métropolitaine et d'Outre-mer entre 2008 et 2017, le CNR a réalisé une étude visant à mieux définir les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques (Hennart et al. Genome Medicine, 2020 ; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33246485/>). Dans cette étude, les souches ont été caractérisées pour leur sensibilité à 19 antibiotiques, dont la pénicilline. La résistance à la pénicilline a été détectée dans 17 % des souches, et des résistances multiples (c'est-à-dire une même bactérie résistant à plusieurs antibiotiques) ont été observées. Par une étude de type « genome wide association study (GWAS) », un gène associé à une faible affinité pour la pénicilline a été découvert. Cela explique la résistance des bactéries, porteuses de ce variant, à l'effet de l'antibiotique. Ce gène, nommé *pbp2m*, a été trouvé dans des lignées génétiques variées de la bactérie, il est donc transmissible horizontalement à de nouvelles lignées. Il est parfois porté par un plasmide et d'autres éléments génétiques porteurs de multiples gènes de résistance. Ce plasmide est nouvellement décrit par cette étude. Enfin, nous avons montré que ce gène confère une résistance non seulement à la pénicilline, mais aussi à divers antibiotiques de la même famille. Par ailleurs, nous avons analysé les liens entre diversité phylogénétique des souches, toxinogénicité et biovar, apportant un éclairage nouveau sur la dynamique évolutive des souches de *C. diphtheriae* et leurs caractéristiques microbiologiques importantes en clinique.

Cette étude nous a amenés à contacter le CA-SFM et l'EUCAST pour redéfinir les seuils critiques (voir plus bas). Nous avons également participé à une étude des souches circulant en Biélorussie (Grosse-Kock et al., 2017).

3.2.3 Épidémiologie globale et taxonomie génomique des souches de *C. diphtheriae*

C. diphtheriae peut provoquer de grandes épidémies de diphtérie là où la couverture vaccinale est insuffisante, et des cas sporadiques ou de petits clusters sont observés dans les régions à forte vaccination. La phylogéographie et l'évolution à court terme de *C. diphtheriae* ne sont pas bien comprises, en partie en raison d'un manque d'approches analytiques harmonisées de surveillance génomique et de suivi des souches. Dans une étude publiée en 2021 (Guglielmini et al., J Clin

Microbiol 2021 ; <https://doi.org/10.1128/JCM.01581-21>), nous avons combiné 1 305 gènes dans un schéma de typage cgMLST. Nous avons analysé la diversité des gènes cgMLST parmi 602 isolats provenant de cas cliniques sporadiques, de petits groupes ou de grandes épidémies. Nous avons défini (i) des sous-lignées en fonction de la structure phylogénétique de *C. diphtheriae* et (ii) des souches en fonction du nombre de différences alléliques cgMLST dans les épidémies documentées. Nous avons montré l'utilité de l'approche cgMLST pour délimiter les groupes de cas liés épidémiologiquement à l'aide d'un seuil de 25 différences alléliques. Nous avons révélé un certain nombre de chaînes de transmission cryptique, dont la plupart sont géographiquement limitées à un ou quelques pays voisins. Les analyses phylogénétiques ont révélé un gain ou une perte évolutive à court terme de la toxine diphtérique et de gènes associés aux biovars. Nous avons conçu une taxonomie génomique des lignées ('sublineages' ; définies à l'aide d'un seuil de différence de 500 allèles cgMLST). Nous décrivons 151 sous-lignées, dont seules quelques-unes sont géographiquement répandues sur la base de l'échantillonnage actuel. L'outil de géotypage et la nomenclature cgMLST ont été rendus publiquement accessibles (<https://bigsgdb.pasteur.fr/diphtheria>). Le géotypage normalisé des souches à l'échelle du génome aidera à retracer la transmission et la propagation géographique de *C. diphtheriae*. La taxonomie génomique unifiée des souches de *C. diphtheriae* que nous avons proposé fournit un langage commun pour les études sur l'écologie, l'évolution et l'hétérogénéité de la virulence parmi les lignées de *C. diphtheriae*.

3.2.4 Étude microbiologique de portage à *C. diphtheriae* chez des patients atteints de mucoviscidose

Lors d'une collaboration avec le CHU de Dijon et le Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), Hôpital d'Enfants, Dijon, nous avons suspecté une possible transmission croisée entre 4 patients atteints de mucoviscidose, colonisés par *C. diphtheriae* entre 2011 et 2016. Le géotypage des isolats par MLST a montré que les 4 isolats ont le même ST, ST208. Le séquençage du génome complet des isolats a confirmé qu'il s'agit d'une seule souche. De plus, certains des patients ont visité le centre de soins le même jour. Une étude de portage chez le personnel soignant du CHU de Dijon, proche des patients, n'a pas révélé de porteur sain. Les antibiogrammes et la génomique ont montré une évolution de la résistance à la ciprofloxacine chez une patiente. Les résultats suggèrent une transmission directe entre patients, et la persistance d'une même souche pendant au moins 6 ans dans cette population. Ces travaux ont été publiés en collaboration avec les collègues de Dijon (Pivot *et al.*, J Clin Microbiol 2019 ; <https://doi.org/10.1128/JCM.00042-19>).

3.2.5 Analyse de cas et descriptions cliniques ponctuelles

Nous collaborons régulièrement avec des collègues biologistes hospitaliers/universitaires sur la description de cas cliniques de diphtérie, en France ou à l'étranger. Nous apportons notre expertise et fournissons les données microbiologiques produites au CNR sur les isolats. La période a vu plusieurs publications de ce type :

Billard-Pomares *et al.*, 2017 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28480263/>);

Scheifer *et al.* 2019 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30583866/>)

Rakotomalala *et al.*, 2020 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33094342/>)

Alberto *et al.*, 2021 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32631628/>)

Levi *et al.*, 2021 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34792439/>)).

3.2.6 Participation à une étude européenne de séro-épidémiologie

Le CNR a participé à une étude européenne dans le cadre du consortium ECDC/EUPert-Labnet de séro-épidémiologie, qui avait pour objectif de déterminer la séroprévalence des anticorps anti-Diphtérie/Tétanos/Coqueluche dans l'Union européenne (UE) et dans l'Espace économique européen (EEE) dans les tranches d'âge de 40 à 49 ans et de 50 à 59 ans. Les 18 pays participants ont chacun collecté environ 500 sérums entre 2015 et 2018 qui ont été analysés pour les anticorps

spécifiques aux IgG-DTC. Pour la diphtérie, la proportion de sérums en dessous du niveau de protection (<0.1 IU/mL) varie entre 22.8–82.0% selon les pays, et de 26 à 42% en France, selon la tranche d'âge. En conclusion de cette étude, le manque de protection vaccinale contre la diphtérie est préoccupant (Berbers et al., Nature Communications 2021; <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23114-y>).

Anecdotiquement, cette collaboration illustre un intérêt d'héberger dans le même laboratoire, les CNR couvrant la diphtérie et la coqueluche, puisque cette étude a été initiée via le réseau Européen des laboratoires de référence de la coqueluche.

3.2.7 Étude de l'épidémie de diphtérie au Yémen, période 2017-2020

Au Yémen, où la guerre civile fait rage depuis 2015, une importante épidémie de diphtérie est en cours depuis octobre 2017. Nous avons étudié les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et microbiologiques de cette épidémie (Badell et al., Lancet Microbe 2021 ; [https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanmic/PIIS2666-5247\(21\)00094-X.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanmic/PIIS2666-5247(21)00094-X.pdf)). Notre étude a reposé sur un ensemble de sources de données collectées au niveau national et sur une collaboration internationale impliquant le CNR et des épidémiologistes et des microbiologistes du Yémen (Laboratoire Central de Santé Publique de Sana'a, NCPHL), de l'Institut Pasteur et en Allemagne. L'épidémie a touché presque tous les gouvernorats (provinces) du Yémen, avec 5701 cas probables et 330 décès sur la période d'octobre 2017 à avril 2020. Nous avons observé que la proportion d'enfants de 0 à 4 ans a été réduite au cours de la deuxième période (juin 2018-mai 2019), après une campagne de vaccination réalisée pour contrôler l'épidémie, suggérant que même si la campagne de vaccination n'a pas permis d'enrayer la transmission de la maladie, elle a contribué à protéger les jeunes enfants lors des périodes épidémiques suivantes. Des souches de *Corynebacterium diphtheriae* ont été caractérisés microbiologiquement au CNR et ont apporté des données précieuses sur la nature des souches infectieuses. Pratiquement tous les isolats d'épidémie (40 sur 43 testés) produisaient la toxine diphtérique. Nous avons montré l'existence de six lignées phylogénétiques distinctes de *C. diphtheriae*, dont quatre ont été génétiquement associées à des isolats d'Arabie Saoudite, d'Érythrée et de Somalie, suggérant une dynamique de transmission régionale. Des variations génomiques inter-lignées dans les gènes associés à la résistance aux antimicrobiens, à l'acquisition du fer et à l'adhésion aux cellules de l'hôte ont été observées. La lignée prédominante (70% des isolats) est résistante au triméthoprim et associée à des caractéristiques génomiques uniques. Son ancêtre commun le plus récent a été placé en 2015, ce qui indique une circulation silencieuse de *C. diphtheriae* au Yémen bien avant la détection officielle de l'épidémie. L'hétérogénéité phénotypique des souches circulantes durant l'épidémie souligne l'importance de développer une capacité d'analyse de laboratoire et une surveillance microbiologique en temps réel durant les épidémies de diphtérie.

3.2.8 Analyse du portage de corynébactéries par les animaux de compagnie

Nous avons réalisé un projet en collaboration avec Santé publique France et des collègues de deux écoles vétérinaires et de la SPA, visant à définir la prévalence et les facteurs de risque de portage de *C. ulcerans* chez les chiens et les chats. Nous avons reçu 740 prélèvements réalisés chez 263 animaux. Sur ces 263 animaux 136 ont été prélevés dans une ENV et 127 dans un dispensaire de la SPA. 52,9% étaient des chats. Les animaux étaient âgés en moyenne de 4,8 ans. 27,8% des animaux prélevés étaient symptomatiques. Plus de 50% des animaux sortaient tous les jours (77,8%), avaient au moins un autre animal dans leur entourage (78,2%) et résidaient dans une unité urbaine de plus de 200 000 habitants (68,5%). Le résultat de la recherche de *C. ulcerans*, par PCR multiplexée en temps réel, s'est avéré négatif sur l'ensemble des prélèvements analysés. Nous n'avons donc pas trouvé d'animaux infectés par des corynébactéries appartenant au complexe *diphtheriae*, dans aucun des types de prélèvement analysés. Ce résultat suggère une très faible prévalence du portage de *C. ulcerans* chez les animaux de compagnie en France. La rédaction des résultats de ce projet est en cours (coordination par Laure Fonteneau, SpF).

3.2.9 Recherche de corynébactéries appartenant au complexe diphtheriae dans la faune sauvage

Étant donné que dans la plupart des cas d'infection humaines à *C. ulcerans*, la transmission de la bactérie se fait à travers de leurs animaux de compagnie, nous avons voulu savoir comment ces animaux ont pu eux-mêmes s'infecter. Ainsi, nous avons cherché à déterminer si en France, et particulièrement en région parisienne, la faune sauvage est porteuse de corynébactéries. Pour ce faire, nous avons collaboré avec le Laboratoire de Santé Animale de l'École Vétérinaire de Maisons-Alfort. Deux cent soixante prélèvements sur des animaux sauvages ont été réalisés en suivant les modes opératoires du CNR. Ces animaux incluaient des hérissons, colombidés, passereaux, rapaces et corvidés. Parmi ces 260 prélèvements, 236 ont pu être analysés par qPCR et/ou culture et MALDI-TOF.

Aucune corynébactérie du complexe *diphtheriae* n'a été identifiée ni par qPCR ni par MALDI-ToF ou galerie API Coryne. Cependant, d'autres corynébactéries ont pu être identifiées : *Corynebacterium kroppenstedtii*, *Corynebacterium falsenii*, *Corynebacterium macginleyi*, chez des pigeons et *Corynebacterium propinquum* chez une chouette hulotte. Il semblerait donc, que de manière similaire aux animaux de compagnie, il y aurait une très faible prévalence du portage de *C. ulcerans* chez les espèces d'animaux analysés. Bien sûr, il sera intéressant d'analyser d'autres espèces d'animaux sauvages à l'avenir.

3.2.10 Collaboration avec Cerba-Vet : infections à *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans* chez l'animal de compagnie

Le CNR reçoit régulièrement des échantillons en provenance du laboratoire Cerba-Vet. En 2020, nous avons initié des contacts avec ce laboratoire pour discuter de ces cas dans leur ensemble, et envisager des études collaboratives. Un travail d'analyse d'une série de 50 cas (2019-2020), et la mise en place de formulaires de renseignements détaillés à destination des propriétaires, sont en cours de préparation.

3.3 CONSEIL AUX PROFESSIONNELS OU AUX AUTORITES DE SANTE, ET ENSEIGNEMENTS

- Conseil aux professionnels

Le site web du CNR donne nos informations de contact : courrier électronique et téléphonique. Nous recevons très régulièrement ces deux types de contacts auxquels nous répondons en temps réel.

Le CNR est joignable aux heures ouvrées par téléphone, aux 4 postes du responsable, des adjoints et du secrétariat, et sur le portable du responsable en cas d'urgence.

Le CNR peut également être joint par courriel (coryne@pasteur.fr).

Ces informations de contact et la liste des jours fériés annuels sont disponibles et mises à jour sur le site web du CNR. Un contact (CIBU) est donné pour les jours non ouvrés.

Entre 2017 et 2021, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel. Nous avons reçu plus de 100 appels de la part de médecins biologistes ou infectiologues qui souhaitaient des renseignements divers sur la diphtérie et/ou sur l'envoi des échantillons au CNR. Ces appels sont tracés sur un support d'enregistrement dédié à cette activité.

- Conseil aux autorités de santé

SpF. Nous sommes en contact quasi-quotidien avec SpF dans le cadre de nos alertes en cas de détection du gène *tox*. Près de 300 alertes (notifications de détection de souches *tox*-positives) ont été réalisées. De plus, nous avons été sollicités régulièrement par les ARS ou CIRE pour demande des conseils sur la conduite à tenir sur des isolats de *C. ulcerans* d'origine vétérinaire.

DGS/HCSP : Utilisation des antitoxines. Le Haut Conseil de la santé publique (HCSP) a été sollicité par la Direction générale de la santé (DGS) pour revoir les indications d'utilisation et de bon usage des antitoxines diphtériques dans un contexte de difficultés d'approvisionnement. Pour répondre à cette nouvelle saisine, la Commission spécialisée Maladies infectieuses et maladies émergentes (CS MIME) du HCSP a mis en place un groupe de travail (GT). Le CNR a délégué Julie Toubiana pour le représenter dans ce GT. Les conclusions sur les indications thérapeutiques ont été publiées : Avis relatif aux recommandations d'utilisation des antitoxines diphtériques en situation de pénurie a été émis (avis du 6 décembre 2019 : <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=756>)

DGS/HCSP : Conduite à tenir autour d'un cas de diphtérie. Le Haut Conseil de la santé publique (HCSP) a reçu de la Direction générale de la santé (DGS) une saisine datée du 1er août 2019. Du fait de nouvelles données épidémiologiques (absence de transmission interhumaine de *C. ulcerans* en 16 ans de surveillance), de l'existence de tests diagnostiques (MALDI-TOF) permettant la mise en évidence de forme asymptomatiques de *C. diphtheriae* et de *C. ulcerans* et de l'intérêt d'ajout de précisions dans la fiche de notification obligatoire, la DGS a sollicité l'expertise du HCSP sur les points suivants :

- conduite à tenir lors de la découverte de sujets porteurs asymptomatiques de *C. ulcerans* ou de *C. diphtheriae* ;
- conduite à tenir dans l'entourage d'une personne présentant un cas de diphtérie à *C. ulcerans* ;
- conduite à tenir autour des cas d'infection à *C. diphtheriae* ou *ulcerans tox*-négatifs
- identification des situations pour lesquelles le résultat de la recherche du gène *tox* doit être obtenu en urgence
- nécessité de compléter la fiche de notification obligatoire.

Un groupe de travail a été constitué, et le CNR a délégué Julie Toubiana pour l'y représenter. Les conclusions sur les indications thérapeutiques ont été publiées sous forme d'un complément à la CAT du 4 mars 2011: [Avis du 10-09-2021 - Haut Conseil de la santé publique relatif à la conduite à tenir autour d'un cas de diphtérie](#)

Centre collaborateur de l'OMS. En 2019-2020, S. Brisse a échangé avec le CC-OMS de la diphtérie (hébergé à Public Health England) sur la mise en place de diagnostic rapide de la diphtérie (outil critique mais actuellement inexistant). Plusieurs rencontres physiques ou téléphoniques ont eu lieu.

Médecins Sans Frontières. MSF est amené à intervenir dans les crises sanitaires et nous a contacté lors de la crise des Rohingyas au Bangladesh et Myanmar (camps de réfugiés), où une épidémie de diphtérie a sévit. Nous avons fourni des conseils sur l'isolement, le transport et la caractérisation des souches.

Conseil à l'INRS / fiches. Le CNR a révisé en mars 2022 pour l'INRS sur sa demande, les fiches de la base de données Baobab (<https://www.inrs.fr/publications/bdd/baobab.html>) concernant les *Corynebacterium*.

Enseignements

Les membres du CNR participent chaque année à des enseignements, formations et encadrements pour des étudiants ou professionnels en médecine ou microbiologie.

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

Communications à la presse

Le CNR a contribué à un article sur *C. ulcerans* dans le journal La Semaine Vétérinaire (n° 1937 - 22/03/2022 Attention au risque de diphtérie à *Corynebacterium ulcerans*), sous forme d'interview/conseil.

Conseils et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public...)

- Les médias et le grand public peuvent trouver des informations sur la diphtérie et les activités du CNR sur notre site web. Aucun conseil n'est donné aux particuliers qui appellent au CNR. Ils sont dirigés vers leur médecin traitant.
- Une page maladie « diphtérie » destinée au grand public a été mise à jour régulièrement en plus du site du CNR: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/diphtherie>
- Les membres du CNR examinent régulièrement des manuscrits soumis pour des publications scientifiques, sur demande des éditeurs des journaux.
- Deux communications 'grand public' ont eu lieu à l'occasion de la publication de notre étude sur la résistance aux antibiotiques (Hennart et al., 2020) et celle de l'épidémie au Yémen (Badell et al., 2021). Ces communications ont lieu via les canaux de diffusion de l'Institut Pasteur (Lettre de l'Institut Pasteur, destinée aux donateurs en particulier et la lettre d'information du *Pasteur network*).
- Sylvain Brisse communique régulièrement sur le réseau social Twitter sur l'actualité de la diphtérie (<https://twitter.com/sylvainbrisse>).

3.4 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

Entre 2017 et 2021, 51 cas d'infection à *C. diphtheriae tox+* ont été rapportés (47 cas cliniques humains et 4 prélèvements vétérinaires). Pour 15 des 19 cas détectés en métropole, une importation a pu être documentée. *C. diphtheriae tox-* a été détecté 402 fois.

C. ulcerans tox+ a été identifié dans 42 cas cliniques humains et dans 156 prélèvements vétérinaires. *C. ulcerans tox-* a été isolé 78 fois et *C. pseudotuberculosis tox-* 6 fois (2 cas humains et 3 vétérinaires).

Les deux nouvelles espèces *C. belfantii* et *C. rouxii* ont été détectées 63 et 21 fois respectivement. Aucun des isolats appartenant à ces 2 espèces ne porte le gène *tox*.

3.4.1 Réseaux et collaborations

Il n'y a pas de réseau structuré de partenaires pour la diphtérie ; la maladie étant à déclaration obligatoire et les isolats faciles à cultiver, tous les laboratoires d'analyse de biologie médicale ou de microbiologie d'hôpital sont susceptibles d'isoler, d'identifier (le plus souvent par MALDI-TOF) et de nous envoyer des isolats. Lors d'une demande d'identification de *C.*

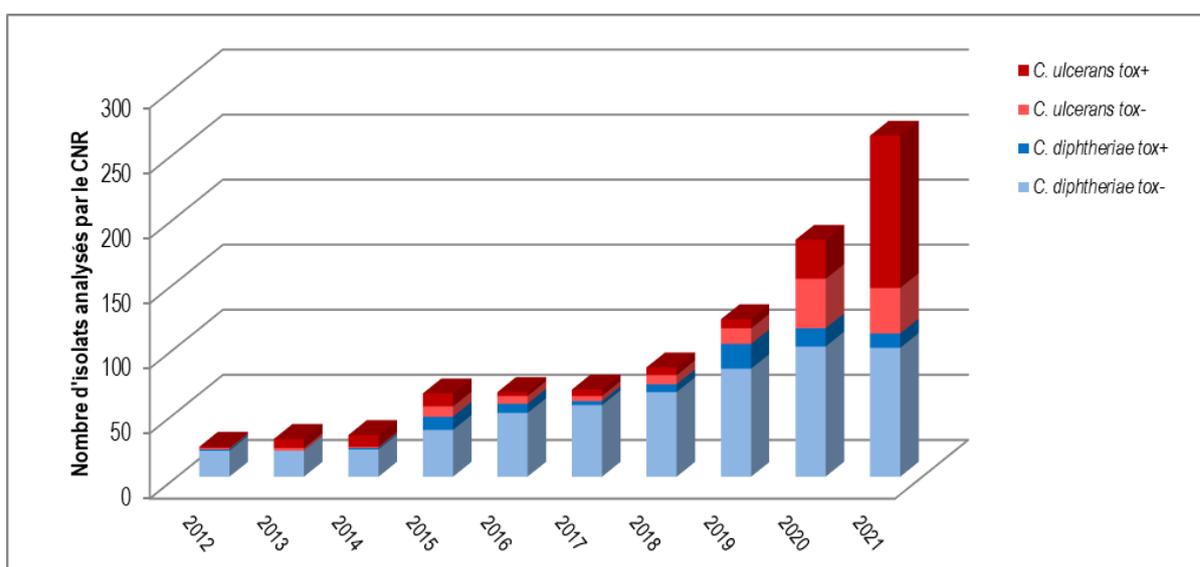
diphtheriae, *C. ulcerans* ou *C. pseudotuberculosis*, le laboratoire expéditeur de la souche complète la fiche de renseignements afin de collecter les informations cliniques pertinentes (y compris présence d'animaux, voyages...fiche disponible sur le site web du CNR). Ces fiches constituent une base importante pour la surveillance de la diphtérie en France.

Entre 2017 et 2021, plus de 200 correspondants distincts nous ont envoyé des échantillons à analyser ; la majorité sont en France Métropolitaine et les autres en Outre-Mer. Ce nombre de correspondants a très nettement augmenté par rapport aux mandats précédents.

3.4.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections : Tendance temporelle

La figure ci-dessous montre que le nombre d'isolats analysés a très fortement augmenté durant les années récentes ; on observe une augmentation d'un facteur 10 en 8 ans. Cette tendance à la hausse prolonge en l'amplifiant, celle observée les années précédentes, qui est continue et concerne toutes les catégories (*tox* positifs ou négatifs, *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans*). Les isolats vétérinaires représentent une contribution importante à cette augmentation. Toutefois, les isolats *tox*-positifs restent minoritaires chez *C. diphtheriae*.

Figure : Analyse temporelle du nombre d'isolats analysés au CNR-CCd entre 2012 et 2021



Plusieurs phénomènes pourraient contribuer à cette augmentation.

D'une part, en 2011 le Haut Conseil de la Santé Publique a publié la conduite à tenir (CAT) lors de l'apparition d'un cas de diphtérie. Cette CAT a certainement sensibilisé le personnel de santé sur le fait d'envoyer les corynébactéries suspectes au CNR.

D'autre part, la généralisation de l'utilisation en routine de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans les laboratoires de biologie médicale a contribué à l'augmentation du nombre d'isolats envoyés au CNR. En effet, les bactéries du complexe *diphtheriae* étaient, avant la généralisation du MALDI-TOF, confondues avec des corynébactéries commensales lors de l'examen direct des colonies. Actuellement, les corynébactéries du complexe sont bien identifiées grâce à cette technique de spectrométrie de masse. De ce fait, beaucoup d'analyses de prélèvements identifient de manière fortuite des *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans*, sans implications clinique claire pour un grand nombre de cas.

L'instabilité politique internationale et les phénomènes de migration depuis 2011, associés à des retards voire à l'absence de vaccination contre la diphtérie, pourtant généralisée à l'échelle mondiale, jouent sans doute également un rôle (*C. diphtheriae tox*-positif a été rapporté plusieurs fois à partir de migrants ou réfugiés non vaccinés).

Enfin, les *C. ulcerans*, dont la majorité sont *tox+*, émergent très nettement et, chez l'homme, sont souvent liés au contact avec des animaux de compagnie. La prise de conscience progressive des laboratoires vétérinaires de la nécessité de faire détecter la toxine diphtérique, participe sans doute majoritairement à l'augmentation récente, plutôt qu'un réel phénomène épidémique. Dans ce contexte, des épidémies dans 2 centres d'élevage (1 élevage de chats et l'autre de chiens) que sévissent depuis la mi-2021 ont fortement contribué à cette augmentation très récente.

Il est possible que *C. diphtheriae* augmente également avec le vieillissement de la population en conjonction avec la baisse de l'immunité liée à une couverture vaccinale plus faible pour cette population nécessitant un rappel.

3.4.3 Origines géographiques des isolats

Le tableau suivant résume les origines des cas et les espèces impliquées. On note que les cas de *C. diphtheriae* proviennent en majorité d'Outre-mer, mais que au contraire, la quasi-totalité des *C. ulcerans* proviennent de France métropolitaine. De même, la majorité des *C. pseudotuberculosis*, *C. belfantii* et *C. rouxii* proviennent de France métropolitaine à l'exception de 2 *C. belfantii* qui proviennent de Nouvelle Calédonie.

Tableau : Nombre d'isolats par espèce et origine géographique

	Métropole (animal)	Guyane	La Réunion	Mayotte	Nouvelle Calédonie	Polynésie	Madagascar	Guadeloupe	Total	
A. isolats tox positifs										
<i>C. diphtheriae</i>	21	4	4	5	11	6	0	1	0	52
<i>C. ulcerans</i>	42	156	0	0	0	0	0	0	0	198
<i>C. belfantii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. rouxii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. pseudotuberculosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
total	63	160	4	5	11	6	0	1	0	250
B. isolats tox négatifs										
<i>C. diphtheriae</i>	97	6	54	14	30	80	6	0	1	288
<i>C. ulcerans</i>	27	46	3	2	0	0	0	0	0	78
<i>C. belfantii</i>	61	0	0	0	0	2	0	0	0	63
<i>C. rouxii</i>	1	20	0	0	0	0	0	0	0	21
<i>C. pseudotuberculosis</i>	2	4	0	0	0	0	0	0	0	6
total	188	76	57	16	30	82	6	0	1	456
TOTAL (A+B)	251	236	61	21	41	88	6	1	1	706

Les chiffres sont des cas humains, sauf pour la seconde colonne

Le tableau suivant résume les caractéristiques cliniques des 314 cas de *C. diphtheriae* et 68 cas *C. ulcerans* humains pour lesquels les données étaient accessibles.

Tableau : Caractéristiques cliniques des cas humains, 2017-2021

Caractéristiques	<i>C. diphtheriae</i>		<i>C. ulcerans</i> #	
	<i>tox</i> -positifs (N=51)	<i>tox</i> -négatifs (N=263)	<i>tox</i> -positifs (N=40)	<i>tox</i> -négatifs (N=28)
Données démographiques				
Age médian (IQR)	29 (12 - 55)	40 (16 - 55)	69 (55 - 82)	75 (61 - 86)
Sexe (% homme)	64	64	62	61
Voyage ## (%) (pour souches Métropole)	83 (15/18)	28 (27/97)	NR	NR
Contact avec animaux (%)	NR	NR	28 (11/40)	11 (3/28)
Origine du prélèvement				
Cutané (%)	86	81	63	57
Respiratoire (%)	10	6	8	7
Autres* (%)	4	4	25	29

* Oreille, sang, etc.

Les *C. rouxii*, *C. belfantii* et *C. pseudotuberculosis* sont décrits dans le texte

Voyage hors Métropole (Outre-Mer ou Étranger)

NR = Non Renseigné

A noter, l'âge médian des patients infectés par *C. ulcerans* est nettement supérieur à celui des cas de *C. diphtheriae*. En revanche, il n'y a pas de différence d'âge notable entre les cas *tox*-positifs et *tox*-négatifs, au sein de chaque espèce. Les hommes sont plus fréquemment infectés que les femmes.

Concernant la notion de voyage précédant l'infection détectée en métropole, les cas *tox*-positifs de *C. diphtheriae* sont fortement associés au voyage, par rapport aux *tox*-négatifs.

Pour les cas humains infectés par *C. ulcerans*, le contact avec des animaux est plus fréquent pour les cas *tox*-positifs.

Les origines des prélèvements cliniques sont peu différentes entre les deux espèces, mais on note toutefois une plus large majorité d'origines cutanées pour *C. diphtheriae*. Les infections de type non-respiratoires, non-cutanées sont plus fréquentes chez *C. ulcerans*.

3.4.4 Autres espèces : *C. pseudotuberculosis*, *C. rouxii* et *C. belfantii*

Sur la période 2017-2021 :

Les 6 isolats de *C. pseudotuberculosis* proviennent de France métropolitaine : 2 ont été isolés chez l'homme, 3 chez des caprins et 1 chez un chat. Ils ont tous été isolés à partir d'abcès, sauf pour le chat (prélèvement auriculaire).

Les 63 isolats *C. belfantii* proviennent en majorité de France métropolitaine à l'exception de 2 isolats originaires de Nouvelle-Calédonie. Les isolats proviennent de prélèvements respiratoires dans 90% (57/63) des cas (30% d'origine ORL et 70% de prélèvements respiratoires profonds) et 6% (4/63) de prélèvements cutanés. Pour 3 cas, l'information de l'origine clinique n'était pas disponible.

Les 21 isolats appartenant à l'espèce *C. rouxii* ont tous été identifiés en France métropolitaine : 20 chez des animaux (chiens et chats) et 1 chez un patient ; 12 ont été isolés sur un prélèvement d'oreille et 9 sur prélèvements cutanés.

Aucun isolat parmi ces 3 espèces ne portait le gène *tox*.

3.4.5 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Toutes les corynébactéries appartenant au complexe *diphtheriae* reçues ou isolées au CNR sont testées par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Si une diminution de la sensibilité au-delà du diamètre critique est mise en évidence, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode des bandelettes à gradient (E-test).

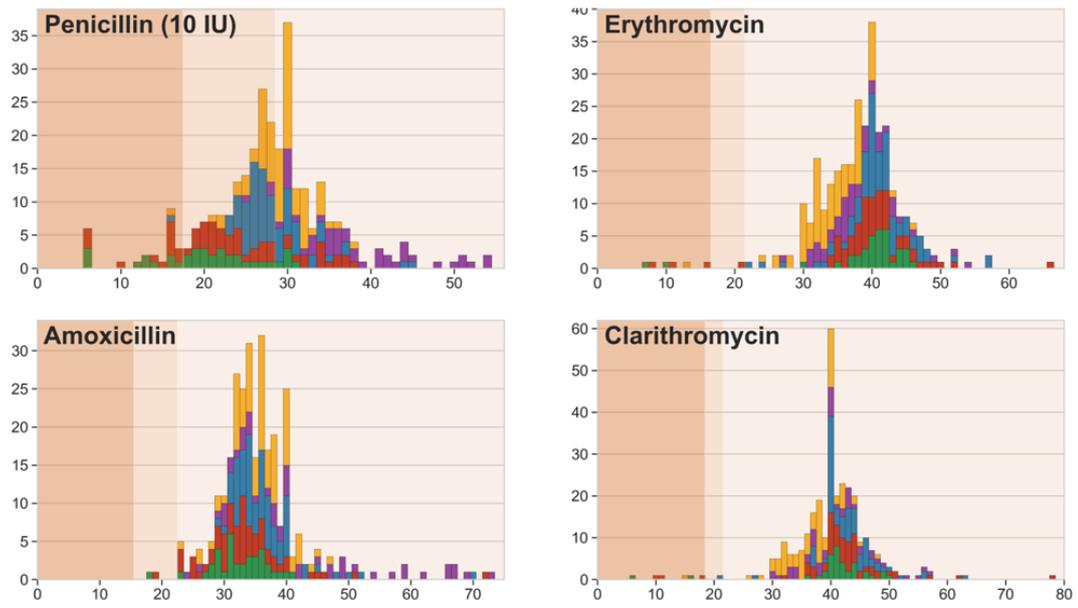
Pour l'interprétation, nous nous basons actuellement sur les seuils de sensibilité des corynébactéries publiés en 2013 et 2019 par le CA-SFM, modifiés par nous suite à l'observation de la distribution naturelle des diamètres (méthode des ECOFFs) (Table S2, Hennart et al., Genome Medicine 2020 ; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33246485/>) ; le lien est donné ci-dessous : <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-020-00805-7#Sec22>.

La figure ci-dessous montre la distribution des diamètres pour les antibiotiques les plus pertinents.

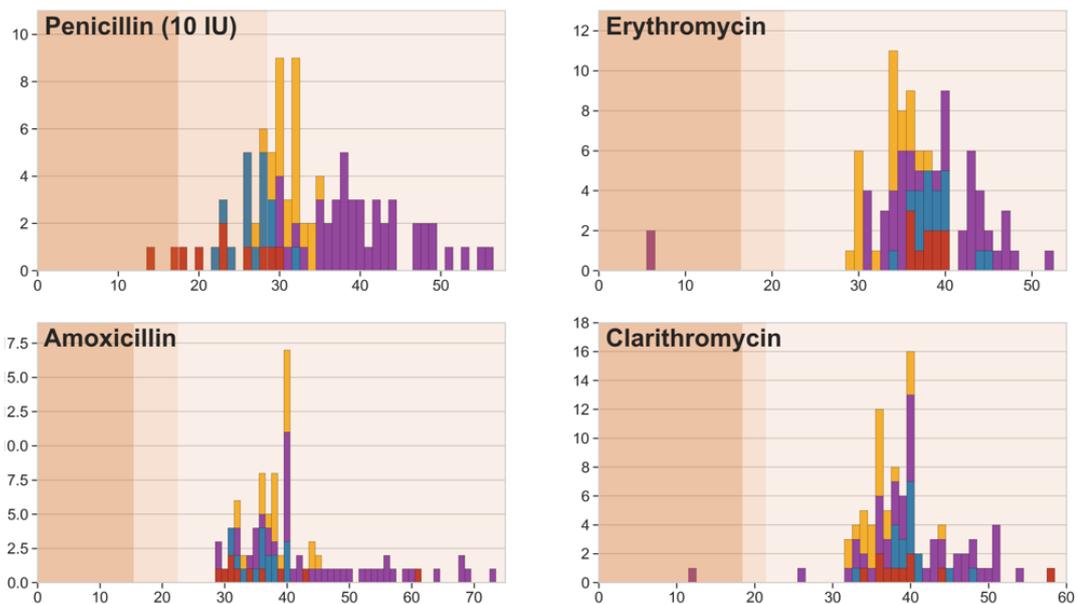
Figure : Distribution des diamètres par rapport aux seuils critiques

En fond d'image, de clair à foncé, les trois zones correspondent à S, I et R, respectivement. Les couleurs des barres correspondent aux années : Vert : 2017 ; Rouge : 2018 ; Bleu : 2019 ; Violet : 2020 ; Jaune : 2021.

C. diphtheriae (incl. *C. rouxii* & *C. belfantii*)



C. ulcerans



Dans l'ensemble, les souches restent sensibles aux antibiotiques de première intention.

Pour l'amoxicilline, les deux espèces *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* sont entièrement sensibles.

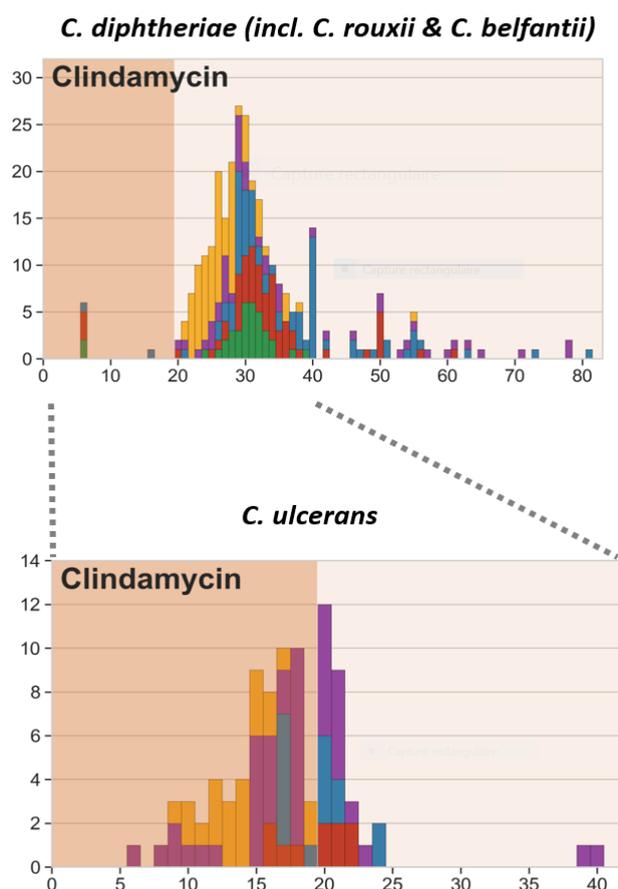
Pour la pénicilline, nous observons peu de sensibilité diminuée chez *C. ulcerans*, mais chez *C. diphtheriae* des isolats de sensibilité de niveau intermédiaire ('sensibles à haute dose'), ou nettement résistants, sont observés. La majorité des isolats qui résistent à la pénicilline ont des valeurs de CMI entre 0,19 et 0,75 mg/L, ce qui représente un bas niveau de résistance. Cependant, 4 isolats *C. diphtheriae* collectés en 2021 ont des valeurs de CMI plus élevées (entre 1,5 et 64 mg/L). Parmi ces 4 isolats, 3 ont été isolés dans la région Ile-de-France et 1 dans la région Hauts-de-France. A noter, le seuil S/I pour la pénicilline coupe la distribution naturelle des valeurs au niveau du mode de la distribution, ce qui interroge clairement sur sa pertinence. Un effort de redéfinition des diamètres critiques est en cours en collaboration avec l'EUCAST (voir section « Programme d'activité pour les années suivantes »).

Pour l'érythromycine, 7 isolats de *C. diphtheriae* et 1 isolat de *C. ulcerans* résistants ont été observés. Parmi les 7 *C. diphtheriae*, 3 ont été isolés dans la région Pays de la Loire, 1 dans Centre Val de Loire, 1 dans Normandie, 1 dans Nouvelle-Aquitaine et 1 en Ile-de-France. Parmi les 3 *C. diphtheriae* isolés dans la région Pays de la Loire, 1 a une CMI > 256 mg/L (isolé en 2017). L'isolat du Centre-Val de Loire a également une CMI > 256 mg/L et a été isolé en 2017. Les autres isolats résistants à l'érythromycine ont des CMI entre 2 et 6 mg/L et ont été isolés entre 2017 et 2021.

Le *C. ulcerans* résistant à l'érythromycine a une CMI > 256 mg/L et a été isolé en 2020.

Figure : Distribution des diamètres pour la clindamycine

Légende : voir figure ci-dessus



Pour la clindamycine, on note une sensibilité naturelle nettement inférieure de *C. ulcerans* par rapport à *C. diphtheriae*. Chez *C. diphtheriae* (au sens large, incluant *C. belfantii* et *C. rouxii*), 7 isolats présentent une résistance sur la base des diamètres d'inhibition, et ces isolats ont une CMI entre 1 et 6 mg/L pour la plupart. Au total, 3 isolats ont des CMI très

élevées : 1 *C. ulcerans* (96 mg/L) et 2 *C. belfantii* (> 256 mg/L). Ces résistances sont associées à la présence d'un gène *ermX* dans le génome bactérien.

Isolats multi-résistants : Nous avons observé des isolats multi-résistants (3 classes ou plus) sur la base de résistance aux antibiotiques suivants : pénicilline, azithromycine, ciprofloxacine, clarithromycine, cotrimoxazole, gentamycine, rifampicine, tétracycline, triméthoprim, kanamycine, sulfaméthoxazole, moxifloxacine et oxacilline (la fosfomycine est ignorée du fait de la résistance naturelle à cet agent chez les corynébactéries).

Trente isolats ont une sensibilité réduite à au moins 3 de ces antibiotiques, 23 à 4 antibiotiques, 7 à 5 antibiotiques, 4 à au moins 6 antibiotiques, 4 isolats sont résistants à 7 antibiotiques et 1 isolat est résistant à 10 antibiotiques.

En ce qui concerne les 4 isolats résistants à 7 antibiotiques, 2 sont des *C. diphtheriae tox+* isolés dans la région Centre Val de Loire : 1 a été isolé en 2018 et il est résistant à la kanamycine, rifampicine, tétracycline, ciprofloxacine, moxifloxacine, au sulfaméthoxazole, et au cotrimoxazole. L'autre a été isolé en 2019 et il est résistant à la ciprofloxacine, rifampicine, tétracycline, kanamycine, moxifloxacine, au triméthoprim et au sulfaméthoxazole. Les autres 2 isolats sont : 1 *C. diphtheriae tox-* et 1 *C. ulcerans tox+*. Les deux ont été isolés dans la région Hautes de France en 2021. Le *C. diphtheriae tox-* est résistant à la gentamycine, oxacilline, moxifloxacine, ciprofloxacine, pénicilline, cefotaxime et au triméthoprim. Le *C. ulcerans tox+* est résistant à la tétracycline, gentamicine, oxacilline, azithromycine, pénicilline, au cotrimoxazole et au triméthoprim.

L'isolat résistant à 10 antibiotiques est un *C. diphtheriae tox-* isolé en 2018 dans la région des Pays de la Loire. Il est résistant à la pénicilline, l'oxacilline, l'érythromycine, la clarithromycine, l'azythromycine, la spiromyicine, la clindamycine, au sulfaméthoxazole, au triméthoprim et au cotrimoxazole.

3.4.6 Apport de la génomique à la surveillance chez *C. diphtheriae*

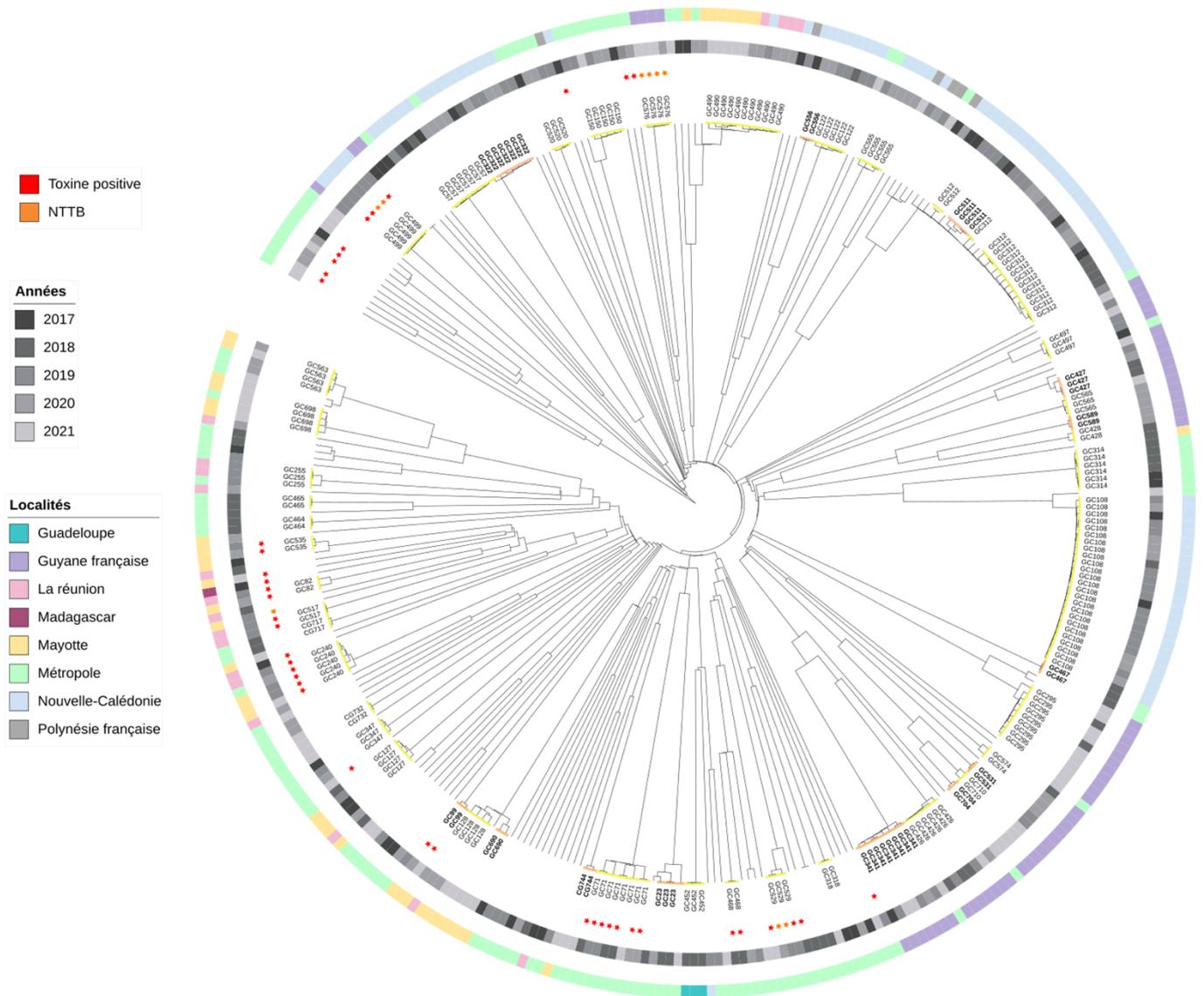
Durant la période 2017-2021, 345 isolats de *C. diphtheriae* ont été séquencés et analysés par génotypage cgMLST. Ce typage génomique permet de révéler une très grande diversité génétique des souches (Figure), avec de nombreuses branches profondes que nous définissons comme des lignées génétiques (la définition précise repose sur le seuil de 500 différences cgMLST).

Le gène de la toxine diphtérique est présent dans une minorité de souches distribuées dans de nombreuses lignées génétiques (Figure), ce qui témoigne sans doute de la mobilité du bactériophage qui porte le gène et le transfère horizontalement entre lignées de *C. diphtheriae*. A noter, plusieurs souches portent le gène mais ont un test d'expression (Elek) négatif (souches NTTB : étoiles oranges sur la figure).

A une échelle de ressemblance phylogénétique plus fine, on distingue 50 groupes génétiques (clusters). Les clusters sont définis comme des groupes d'isolats qui ont moins de 25 gènes ayant une séquence différente avec au moins un autre membre du groupe, sur les 1305 gènes inclus dans le schéma de typage cgMLST. Ces groupes sont surlignées en jaune (ou alternativement en orange) dans les branches de l'arbre de la figure. Il est à noter que la définition des clusters est très ample, ce qui implique qu'ils ne correspondent pas nécessairement à des chaînes de transmission récentes (on s'attend à une vitesse d'évolution d'environ 1 gène cgMLST modifié par an). On constate d'ailleurs que la plupart des clusters ont été isolés durant plusieurs années.

Figure : Diversité génétique des souches de *C. diphtheriae* reçues au CNR, 2017-2021

Légende : le dendrogramme a été créé par comparaison des profils alléliques cgMLST. Les groupes clonaux (GC) correspondent aux clusters génomiques (seuil de 25 différences, voir texte). Les étoiles rouge ou orange correspondent aux souches tox-positives. Les années et origines d'isolement sont indiquées sur les deux cercles externes (voir clé de couleurs).



On observe que la majorité des clusters sont restreints géographiquement, toutes les souches d'un même cluster ayant typiquement la même origine, soit d'un DROM-COM (départements et régions d'outre-mer et collectivités d'outre-mer) particulier, soit de Métropole. On note toutefois que pour de nombreuses souches isolées en métropole, une majorité des souches du même cluster viennent de La Réunion ou Mayotte, et plus rarement avec la Guyane et la Nouvelle-Calédonie. Même si les clusters génétiques correspondent essentiellement à des chaînes de transmission localisées, des cas d'importation en métropole ne sont donc pas rares.

La majorité de ces clusters ne comprennent que des souches tox-négatives.

Nous avons néanmoins identifié 10 clusters de souches tox-positives :

- Le cluster 71 comprend 8 souches tox-positives isolées en métropole, dans différentes régions.
- Le cluster 240 comprend 5 souches isolées à Mayotte, La Réunion et Métropole.
- Le cluster 499 comprend 5 souches isolées Nouvelle-Calédonie.
- Le cluster 576 comprend 4 souches de Guyane.
- Le cluster 529 est un triplet de souches isolées en métropole.
- Le cluster 468 est une paire de souches isolées à Paris.
- Le cluster 82 est une paire de souches isolées à Mayotte et La Réunion.
- Le cluster 99 et le cluster 535 sont deux paires de souches isolées à Mayotte.
- Le cluster 517 est une paire de souches isolées à La Réunion.

Ces clusters peuvent correspondre à des investigations autour de cas (cas du cluster 499) ou de groupes de souches d'un même patient ou foyer (cas de sous-ensembles du cluster 71) mais sont le plus souvent détectés par génomique, sans lien épidémiologique apparent ou documenté. Par ailleurs, la majorité de ces clusters sont isolés sur plusieurs années : il ne s'agit donc pas de transmissions directes mais plutôt de chaîne de transmissions de très longue durée dont on échantillonne seulement quelques cas. Ce scénario pourrait être expliqué non exclusivement par un portage asymptomatique ou par le fait que le système de surveillance ne capture pas de nombreux cas intermédiaires entre ceux qui sont détectés.

Ces données de surveillance illustrent le potentiel de la génomique pour identifier des cas groupés et investiguer d'éventuelles sources ou voies de transmissions afin de rompre la contamination. Ces perspectives feront l'objet de discussions avec nos partenaires de SpF pour définir le rôle que pourrait jouer le séquençage génomique pour mieux contrôler la diphtérie.

Un travail similaire sera réalisé pour *C. ulcerans* dans les années à venir. Il devrait apporter de nouvelles informations sur la transmission de ce pathogène zoonotique à l'échelle nationale et pourra dégager des pistes pour un meilleur contrôle de ces infections.

3.5 CONTRIBUTION A L'ALERTE

Les alertes sont réalisées selon les recommandations de 2011

(https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspr20110304_conduitediphtherie.pdf) actualisées en 2021

(https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspra20210910_avrelacoteauduncadediac.pdf).

Lors d'une demande d'identification de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ou *C. pseudotuberculosis* au CNR, le laboratoire expéditeur de la souche complète une fiche de renseignement sur laquelle sont collectées des informations cliniques ainsi que des données sur le mode de vie du patient (présence d'animaux, voyages...). Ces données sont utiles dans le contexte de l'alerte.

Lorsque le CNR détecte la présence du gène *tox*, il contacte SpF par courriel (dmi-diphtherie@santepubliquefrance.fr) ainsi que le laboratoire expéditeur et l'ARS concernée.

Sur la période 2017-2021, le CNR a émis 250 alertes.

4 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS NATIONALES

1. Guiso N. Le nouveau visage de la diphtérie. Revue francophone des Laboratoire (2012) 439Bis:34-35

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

1. Barraud O, Badell E, Denis F, Guiso N, Ploy MC. (2011) Antimicrobial drug resistance in *Corynebacterium diphtheriae* mitis. *Emerg Infect Dis.* 17(11):2078-80.
2. Rousseau C, Belchior E, Broche B, Badell E, Guiso N, Laharie I, Patey O, Lévy-Bruhl D. (2011) Diphtheria in the south of France. **Euro Surveill.** May 12;16(19):pii=19867.
3. Farfour E, Badell E, Zasada A, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, Guiso N. (2012). Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. **J Clin Microbiol.**50(1):173-5.
4. Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, Le Guern AS, Leflèche A, Badell E, Guiso N, Leclercq A, Le Monnier A, Lecuit M, Rodriguez-Nava V, Bergeron E, Raymond J, Vimont S, Bille E, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, Lécuyer H, Beretti JL, Vay C, Berche P, Ferroni A, Nassif X, Join-Lambert O. J. (2012) Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. **J. Clin Microbiol.** Aug;50(8):2702-7.
5. Viguetti SZ, Pacheco LG, Santos LS, Soares SC, Bolt F, Baldwin A, Dowson CG, Rosso ML, Guiso N, Miyoshi A, Hirata R, Jr, Mattos -Guaraldi AL, Azevedo V. (2012). Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. **Epidemiol Infect** 140: 617–620. 10.1017/S0950268811000963.
6. Farfour E, Badell E, Dinu S, Guillot S, Guiso N. (2013) Microbiological changes and diversity in autochthonous non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated in France. **Clin Microbiol Infect.** Oct;19(10):980-7.
7. Dinu S, Damian M, Badell E, Dragomirescu CC, Guiso N. New diphtheria toxin repressor types depicted in a Romanian collection of *Corynebacterium diphtheriae* isolates (2014). **J Basic Microbio.** Oct;54(10):1136-9.
8. Both L, Neal S, De Zoysa A, Mann G, Czumbel I, Efstratiou A; Members of the European Diphtheria Surveillance Network. External quality assessments for microbiologic diagnosis of diphtheria in Europe (2014). *J Clin Microbiol.* Dec;52(12):4381-4. doi: 10.1128/JCM.01776-14. Epub 2014 Oct 8.
9. Farfour E, Badell E, Jacques Natali L, Dommergues MA, Blot S, Guiso N, Pangon B, Foucaud P. Answer to october 2014 photo quiz (2014). *J Clin Microbiol.* Oct;52(10):3832.
10. Farfour E, Badell E, Jacques Natali L, Dommergues MA, Blot S, Guiso N, Pangon B, Foucaud P. Photo quiz: multiple skin lesions on a 9-year-old boy returning from mali (2014). **J Clin Microbiol.** Oct;52(10):3523.
11. Zasada AA, Formińska K, Wołkowicz T, Badell E, Guiso N. The utility of the PCR melting profile technique for typing *Corynebacterium diphtheriae* isolates (2014). **Lett Appl Microbiol.** Sep;59(3):292-8.
12. Vandentorren S, Guiso N, Badell E, Boisrenoult P, Micaelo M, Troché G, Lecouls P, Moquet MJ, Patey O, Belchior E. Toxicogenic *Corynebacterium ulcerans* in a fatal human case and her feline contacts, France, March 2014 (2014). **EuroSurveill.**;19(38):pii=20910. (<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20910>)
13. Silva Ado S, Baraúna RA, de Sá PC, das Graças DA, Carneiro AR, Thouvenin M, Azevedo V, Badell E, Guiso N, da Silva AL, Ramos RT. Draft Genome Sequence of *Corynebacterium ulcerans* FRC58, Isolated from the Bronchitic Aspiration of a Patient in France (2014). **Genome Announc.** Jan 9;2(1).
14. Benevides LDJ, Viana MVC, Mariano DCB, Rocha FDS, Bagano PC, Folador EL, Pereira FL, Dorella FA, Leal CAG, Carvalho AF, Soares SDC, Carneiro A, Ramos R, Badell-Ocando E, Guiso N, Silva A, Figueiredo H, Azevedo V, Guimarães LC. (2015). Genome sequence of *Corynebacterium ulcerans* strain FRC11. **Genome Announc** 3(2):e00112-15. doi:10.1128/genomeA.00112-15.
15. Thouvenin M, Beilouny B, Badell E, Guiso N. *Corynebacterium ulcerans* pulmonary infection. **Ann Biol Clin** (Paris). 2016 Jan-Feb;74(1):117-20. doi: 10.1684/abc.2015.1120. French.
16. Guimarães LC, Viana MV, Benevides LJ, Mariano DC, Veras AA, Sá PH, Rocha FS, Vilas Boas PC, Soares SC, Barbosa MS, Guiso N, Badell E, Carneiro AR, Azevedo V, Ramos RT, Silva A. Draft Genome Sequence of Toxicogenic *Corynebacterium ulcerans* Strain 04-7514, Isolated from a Dog in France. **Genome Announc.** 2016 Mar 31;4(2). pii: e00172-16. doi: 10.1128/genomeA.00172-16.
17. Guimarães LC, Viana MV, Benevides LJ, Mariano DC, Veras AA, Sá PH, Rocha FS, Vilas Boas PC, Soares SC, Barbosa MS, Guiso N, Badell E, Carneiro AR, Azevedo V, Ramos RT, Silva A. Draft Genome Sequence of *Corynebacterium ulcerans* Strain 04-3911, Isolated from Humans. **Genome Announc.** 2016 Mar 31;4(2). pii: e00171-16. doi: 10.1128/genomeA.00171-16.

18. Guimarães LC, Lopes T, Ramos RT, Carneiro AR, Cavalcante AL, Barreto D, de Sá PC, Veras AA, Rocha FS, Bagano P, Pereira FL, Dorella FA, Leal CA, Carvalho AF, Bizet C, Guiso N, Badell E, Figueiredo HC, Azevedo V, Silva A. Draft Genome Sequences of Two Pathogenic Corynebacterial Species Isolated from Cows. **J Genomics**. 2016 Mar 2;4:7-9. doi: 10.7150/jgen.14456. eCollection 2016.
19. Guimarães LC, Viana MV, Benevides LJ, Mariano DC, Veras AA, Sá PH, Rocha FS, Vilas Boas PC, Soares SC, Barbosa MS, Guiso N, Badell E, Azevedo V, Ramos RT, Silva A. Draft Genome Sequence of Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Strain 03-8664 Isolated from a Human Throat. **Genome Announc**. 2016 Jul 28;4(4). pii: e00719-16. doi: 10.1128/genomeA.00719-16 .
20. Benamrouche N, Hasnaoui S, Badell E, Guettou B, Lazri M, Guiso N, Rahal K. Microbiological and molecular characterization of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Algeria between 1992 and 2015. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Dec;22(12):1005.e1-1005.e7. doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.013. Epub 2016 Aug 29.
21. Billard-Pomares T, Rouyer C, Walewski V, Badell-Ocando E, Dumas M, Zumelzu C, Jauregui F, Brisse S, Caux F, Bouchaud O, Carbonnelle E. Diagnosis in France of a Non-Toxigenic tox Gene-Bearing Strain of *Corynebacterium diphtheriae* in a Young Male Back From Senegal. *Open Forum Infect Dis*. 2017 Jan 9;4(1):ofw271. doi: 10.1093/ofid/ofw271. eCollection 2017 Winter.
22. Grosse-Kock S, Kolodkina V, Schwalbe EC, Blom J, Burkovski A, Hoskisson PA, Brisse S, Smith D, Sutcliffe IC, Titov L, Sangal V. Genomic analysis of endemic clones of toxigenic and non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Belarus during and after the major epidemic in 1990s. *BMC Genomics*. 2017 Nov 13;18(1):873. doi: 10.1186/s12864-017-4276-3.
23. Dazas M, Badell E, Carmi-Leroy A, Criscuolo A, Brisse S. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018 Dec;68(12):3826-3831. doi: 10.1099/ijsem.0.003069. Epub 2018 Oct 24.
24. Pivot D, Fanton A, Badell-Ocando E, Benouachkou M, Astruc K, Huet F, Amoureux L, Neuwirth C, Criscuolo A, Aho S, Toubiana J, Brisse S. Carriage of a Single Strain of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* bv. Belfanti (*Corynebacterium belfantii*) in Four Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2019 Apr 26;57(5):e00042-19. doi: 10.1128/JCM.00042-19. Print 2019 May.
25. Scheifer C, Rolland-Debord C, Badell E, Reibel F, Aubry A, Perignon A, Patey O, Brisse S, Caumes E. Re-emergence of *Corynebacterium diphtheriae*. *Med Mal Infect*. 2019 Sep;49(6):463-466. doi: 10.1016/j.medmal.2018.12.001. Epub 2018 Dec 21.
26. Badell E, Guillot S, Tulliez M, Pascal M, Panunzi LG, Rose S, Litt D, Fry NK, Brisse S. Improved quadruplex real-time PCR assay for the diagnosis of diphtheria. *J Med Microbiol*. 2019 Oct;68(10):1455-1465. doi: 10.1099/jmm.0.001070. Epub 2019 Sep 3.
27. Badell E, Hennart M, Rodrigues C, Passet V, Dazas M, Panunzi L, Bouchez V, Carmi-Leroy A, Toubiana J, Brisse S. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the *diphtheriae* species complex. *Res Microbiol*. 2020 Apr-Jun;171(3-4):122-127. doi: 10.1016/j.resmic.2020.02.003. Epub 2020 Feb 28
28. Hennart M, Panunzi LG, Rodrigues C, Gaday Q, Baines SL, Barros-Pinkelnic M, Carmi-Leroy A, Dazas M, Wehenkel AM, Didelot X, Toubiana J, Badell E, Brisse S. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. *Genome Med*. 2020 Nov 27;12(1):107. doi: 10.1186/s13073-020-00805-7.
29. Rakotomalala RS, Andrianirina ZZ, Ratsima E, Randrianandraina P, Randrianirina F, Edosoa GT, Rabenandrianina T, Badell E, Toubiana J, Andrianarimanana D, Brisse S, Rasamindrakotroka A. *Corynebacterium diphtheriae* Infection in Mahajanga, Madagascar: First Case Report. *J Trop Pediatr*. 2021 Jan 29;67(1):fmaa064. doi: 10.1093/tropej/fmaa064.
30. Badell E, Alharazi A, Criscuolo A, Almoayed KAA, Lefrancq N, Bouchez V, Guglielmini J, Hennart M, Carmi-Leroy A, Zidane N, Pascal-Perrigault M, Lebreton M, Martini H, Salje H, Toubiana J, Dureab F, Dhabaan G, Brisse S; NCPHL diphtheria outbreak working group. Ongoing diphtheria outbreak in Yemen: a cross-sectional and genomic epidemiology study. *Lancet Microbe*. 2021 Aug;2(8):e386-e396. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00094-X. Epub 2021 May 26.
31. Guglielmini J, Hennart M, Badell E, Toubiana J, Criscuolo A, Brisse S. Genomic Epidemiology and Strain Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Clin Microbiol*. 2021 Nov 18;59(12):e0158121. doi: 10.1128/JCM.01581-21. Epub 2021 Sep 15.
32. Levi LI, Barbut F, Chopin D, Rondeau P, Lalande V, Jolivet S, Badell E, Brisse S, Lacombe K, Surgers L. Cutaneous diphtheria: three case-reports to discuss determinants of re-emergence in resource-rich settings. *Emerg Microbes Infect*. 2021 Dec;10(1):2300-2302. doi: 10.1080/22221751.2021.2008774.

4.1 COMMUNICATIONS NATIONALES

Edgar Badell:

« *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*: Are those forgotten bacteria evolving according to herd immunity? Congrès "Microorganisms facing their environment" Muséum d'Histoire Naturelle. Paris, France 27-28 Octobre 2011.

"Analyse des populations de *C. diphtheriae* isolées à Mayotte". CNIT. 34e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse "RICAI". La Défense, Paris. 27-28 novembre 2014

Sylvain Brisse :

- RICAI, décembre 2020 : *C. diphtheriae* : caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques et découverte d'un gène de résistance à la pénicilline
- Symposium U Paris Cité – Institut Pasteur, 30 nov 2021 : *C. diphtheriae* : caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques et découverte d'un gène de résistance à la pénicilline
- Congrès de la Société Française de Microbiologie, Sept 2021 : Ongoing diphtheria outbreak in Yemen : Epidemiological, clinical and genomic insights

4.2 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

Sylvain Brisse :

- Conférence internationale InterYem, 15 mai 2021 : Characteristics of the 2017-2021 diphtheria outbreak in Yemen
- Wellcome conférence sur l'Antibiorésistance (Sanger Institute), Nov 2020 : Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*

4.3 CONFERENCES SUR INVITATIONS

Sylvain Brisse :

- Conférence internationale InterYem, 15 mai 2021 : Characteristics of the 2017-2021 diphtheria outbreak in Yemen

4.4 PARTENARIATS OU COLLABORATIONS AVEC DES STRUCTURES OU INSTANCES NATIONALES OU INTERNATIONALES (EN SANTE ANIMALE OU ENVIRONNEMENTALE, OMS, ECDC,

Nos principaux partenariats sont décrits dans la section « Conseil » en 3.2 et dans la partie « réseaux » en 7.1.1.

En bref, nous avons collaboré avec la DGS et le HCSP, l'INRS, le centre OMS pour la diphtérie, MSF, l'EUCAST, nos homologues à l'international (UKSHA, Allemagne, Belgique), ainsi que les laboratoires d'analyse médicale vétérinaire en métropole.

5 DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU CNR

5.1 DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE

Le CNR des corynébactéries du complexe *diphtheriae* et plus généralement, l'Unité de recherche « Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes » (BEBP) qui l'héberge, ont mis en place depuis plusieurs années une démarche d'assurance qualité basée d'une part sur un système documentaire qui décrit l'organisation de l'unité, les modes opératoires techniques et l'enregistrement des données et d'autre part sur un système de management de la qualité qui l'engage dans une démarche d'amélioration continue de la qualité.

La réforme de la biologie médicale de 2010 exige l'accréditation des CNR par le COFRAC selon la norme ISO 15189. Les CNR hébergés à l'Institut Pasteur sont regroupés dans une structure nommée LREMS (Laboratoires de Référence et d'Expertise Multi-Sites) où chaque CNR est un site. Le LREMS a défini une politique qualité et dispose d'un service qualité qui comprend 2 ingénieurs qualité qui ont pour mission d'aider les CNR dans leur démarche qualité, d'organiser les audits internes, d'harmoniser le système qualité des CNR au sein du LREMS et de veiller à la mise en conformité des documents et processus selon la norme EN ISO 15189. Ces activités sont décrites en détails en Annexe.

Le CNR a obtenu l'accréditation ISO 15189 en novembre 2013 pour la technique « Détection de la toxine diphtérique par PCR en point final ». Depuis lors, le CNR poursuit sa démarche d'amélioration continue de la qualité.

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

Lors du renouvellement de l'accréditation en 2021 nous avons accrédité la technique « Identification des corynébactéries du complexe *diphtheriae* et détection du gène *tox* par PCR multiplex en temps réel » et la PCR en point final a été retirée de l'accréditation.

La démarche qualité est décrite de manière plus détaillée dans l'annexe 1 « Processus qualité ».

5.2 RECONNAISSANCE DU LABORATOIRE PAR DES INSTANCES NATIONALES OU INTERNATIONALES

Dans le cadre de son accréditation, le CNR participe annuellement à des comparaisons inter-laboratoires pour l'identification des corynébactéries du complexe *diphtheriae* et la détection du gène *tox*.

5.3 GESTION DE LA CONFIDENTIALITE

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

Au CNR, la confidentialité des données est garantie par :

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

La gestion de la confidentialité est décrite de manière plus détaillée dans l'annexe 2 « Organisation des CNR à l'Institut Pasteur ».

6 DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

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

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

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

Les points qui concernent spécifiquement le CNR Corynébactéries du complexe *diphtheriae* sont décrits ci-dessous.

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

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

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

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

Le programme de travail proposé pour le mandat 2023-2027 est dans la continuité du programme réalisé en 2017-2021 (décrit dans ce document) et 2022. Nous maintiendrons et développerons nos réseaux de partenaires, poursuivrons notre programme de développement de méthodes d'analyses, maintiendrons nos activités d'expertise et de surveillance en les développant en particulier dans le domaine de *C. ulcerans* (réservoirs et transmission zoonotique), et assurerons nos missions de conseil et d'alerte.

7.1 ACTIVITES D'EXPERTISE

7.1.1 Réseaux de partenaires (cliniciens, laboratoires de biologie médicale) au niveau national, incluant les outre-mer et collaborations à constituer ou renforcer

Réseaux en clinique humaine en France. Nous continuerons à être, du fait de nos missions, en contact avec tous les laboratoires qui isolent ou suspectent la présence de pathogènes du complexe *diphtheriae* dans des prélèvements. Les corynébactéries sont faciles à cultiver et la méthodologie d'identification s'est nettement améliorée récemment avec l'avènement du MALDI-TOF. La déclaration obligatoire fait que le CNR sera en principe contacté dans la totalité des cas ; nous avons actuellement plus de 300 correspondants. Nous connaissons particulièrement bien nos partenaires biologistes et cliniciens d'Outre-mer avec qui nous sommes en contact régulier (transferts de modes opératoires pour un diagnostic plus rapide en local ; et études ponctuelles de l'épidémiologie locale).

Santé animale et caractère zoonotique. Notre objectif sera de continuer à développer les réseaux vers le versant animal, à la fois pour mieux connaître la prévalence des infections et caractériser les isolats en santé animale ; et pour mieux définir le rôle des animaux, de compagnie en particulier mais aussi de la faune sauvage, dans l'émergence des infections à *C. ulcerans* (voir partie projets).

International. Au-delà de notre rôle de référence en France, l'objectif de l'unité de recherche hébergeant le CNR est de disséminer nos approches analytiques et de contribuer à la surveillance à l'échelle internationale, ainsi que de comparer la situation épidémiologique de la France avec celle d'autres pays. Pour cela, nous avons des contacts avec de nombreux laboratoires de référence : par exemple Européens, UKSHA, Canada, USA (CDC) ou Yemen (NCPHL). Au-delà d'un renforcement des connaissances sur les méthodes de référence, les opportunités ouvertes par le séquençage génomique des souches et les besoins d'harmonisation des méthodes d'analyse des données créent un contexte favorable pour la réactivation d'une coopération à l'international, que nous nous efforcerons de promouvoir.

Par ailleurs, des contacts ont été pris avec le Centre OMS de la diphtérie (UKSHA) et Senova Diagnostics (Allemagne) pour le développement d'un diagnostic rapide de la diphtérie.

Enfin, nous collaborons avec l'EUCAST et le centre de référence Allemand (A. Sing, Bavière) sur la définition des seuils critiques de sensibilité aux antibiotiques.

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

Cette partie a été supprimée du rapport public

7.2 TRAVAUX DE RECHERCHE APPLIQUES ENVISAGES EN LIEN AVEC LES MISSIONS DU CNR

7.2.1 Caractérisation des isolats résistants aux antibiotiques et développement de seuils critiques

Nous caractérisons systématiquement la sensibilité aux antibiotiques des isolats du CNR, et observons souvent des résistances (voir plus haut), même si l'impact en santé publique de la résistance aux antibiotiques chez l'agent de la diphtérie reste mineur. Néanmoins, les seuils critiques sont pas ou mal définis pour *C. diphtheriae* et *C. ulcerans*, les deux espèces cliniquement les plus importantes du complexe diphtheriae.

En collaboration avec le laboratoire de développement de l'EUCAST (Gunnar Kahlmeter et collègues) et le laboratoire de référence allemand en Bavière (Andreas Sing et collègues), nous chercherons à définir les seuils critiques pour *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* de manière robuste, sur la base de la distribution naturelle qui permettra également de définir des cut-offs écologiques (ECOFFs).

Ce travail est déjà très avancé ; 400 souches ont été testées par la méthode des diamètres et de microdilution en plaques (CMI), pour les antibiotiques les plus pertinents. Les analyses sont en cours et une réunion de proposition de seuils critiques du comité de l'EUCAST est prévue (juin 2022), à laquelle nous participerons.

7.2.2 Diversité génomique des isolats de *C. ulcerans*

La diversité génomique de *C. ulcerans* reste mal caractérisée et cela représente un frein à la compréhension de la diffusion des souches en France, en particulier au sein des populations animales. Récemment, plus d'un siècle après la découverte de la toxine, le séquençage génomique de souches de *C. ulcerans* a révélé qu'en plus du phage toxigène, d'autres éléments génétiques sont porteurs du gène *tox* dans cette espèce. Mais comme pour *C. diphtheriae*, la dynamique de ces éléments est inconnue, on ne sait pas s'ils se transfèrent horizontalement, par exemple, ou s'ils peuvent être perdus fréquemment (rendant les souches non toxigènes).

Notre programme de séquençage génomique systématique des isolats du CNR a généré plusieurs centaines de séquences, qui seront analysées en regard des séquences publiquement disponibles à l'international, pour définir la diversité et la structure phylogénétique de *C. ulcerans*, et les liens entre cette diversité de lignées clonales et les caractéristiques importantes médicalement, comme le portage du gène *tox*, et la résistance aux antibiotiques (qui reste néanmoins rare chez *C. ulcerans*). Ce travail sera symétrique à notre étude récemment publiée sur *C. diphtheriae* (Hennart et al., Genome Med, 2021).

7.2.3 Infections à *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans* chez l'animal de compagnie

Le CNR reçoit régulièrement des échantillons en provenance du laboratoire Cerba-Vet. En 2020, nous avons initié des contacts avec ce laboratoire pour discuter de ces cas dans leur ensemble, et envisager des études collaboratives. Une analyse d'une série de 50 cas (2019-2020) est en cours.

7.2.4 Cette partie a été supprimée du rapport public

7.2.5 Etudes de l'épidémiologie moléculaire de la diphtérie en Nouvelle-Calédonie, La Réunion et en Guyane Française

Des études dédiées à ces trois Départements/Territoires d'Outre-Mer/Collectivités sont en cours avec les biologistes et cliniciens locaux, afin de comprendre la diversité et l'épidémiologie des souches dans ces localités. Ces collaborations incluent également les ARS/CIRE locales. Elles seront finalisées prochainement.

7.2.6 Microbiologie des biovars de *C. diphtheriae* et *C. pseudotuberculosis* et liens avec les données cliniques

Cette partie a été supprimée du rapport public

7.3 POSSIBILITE DE MONTEE EN CHARGE DES CAPACITES POUR REpondre A UNE SITUATION SANITAIRE EXCEPTIONNELLE ET LES MODALITES EFFECTIVES DE MISE EN ŒUVRE (REORGANISATION, TRANSFERT DE RESSOURCES, MOBILISATION DE PARTENAIRES...).

La crise en Ukraine et plus généralement les incertitudes politiques à l'international peuvent faire craindre une recrudescence de la diphtérie, y compris en France (cas importés). Néanmoins il est peu probable que cela déborde les capacités du CNR. Dans tous les cas, certains laboratoires de CHU nous ont contactés pour nos modes opératoires (qPCR *tox*), que nous partageons dans l'éventualité de phénomènes trop volumineux. En cas de besoin, nous serons proactifs pour distribuer nos modes opératoires plus systématiquement. Cette montée en charge par distribution des capacités de diagnostic devrait permettre de faire face.

7.4 ACTIVITES DE CONSEIL, FORMATION ET INFORMATION

Nous continuerons d'apporter à nos correspondants, nos conseils pour l'aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés, ce qui inclut l'envoi des recommandations sur la conduite à tenir aux professionnels de la santé.

La nomination (validée par nos correspondants à SpF) de Pierre Tattevin en tant que référent clinique suppléant de Julie Toubiana (en remplacement du Dr Olivier Patey), permettra une continuité pour l'expertise clinique pour répondre aux questions de nos correspondants sur la vaccination et les méthodes de prévention, le diagnostic et les traitements.

Le CNR prendra également part aux réunions *ad-hoc* de la DGS, Santé Publique France et les ARS, et apportera son expertise aux discussions sur les diagnostics biologiques ou l'utilisation des anti-toxines diphtériques. Le CNR contribuera à l'évolution des stratégies vaccinales si nécessaire.

Nous poursuivons nos missions d'enseignement, de formation et d'accueil de stagiaires ou de professionnels désireux de renforcer leurs capacités en microbiologie des corynébactéries du complexe *diphtheriae*.

Les informations concernant le CNR sont disponibles aux professionnels de santé et au grand public via notre site web : (<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/corynebacteries-du-complexe-diphtheriae>), et seront régulièrement mises à jour.

7.5 CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

7.5.1 Constitution, développement et animation de réseaux

Réseaux en clinique humaine en France. Nous continuerons à être, du fait de nos missions, en contact avec tous les laboratoires qui isolent ou suspectent la présence de pathogènes du complexe *diphtheriae* dans des prélèvements. Les corynébactéries sont faciles à cultiver et la méthodologie d'identification s'est nettement améliorée récemment avec l'avènement du MALDI-TOF. La déclaration obligatoire fait que le CNR sera en principe contacté dans la totalité des cas.

Santé animale et caractère zoonotique. Notre objectif sera de continuer à développer les réseaux vers le versant animal, à la fois pour mieux connaître la prévalence des infections et caractériser les isolats en santé animale ; et pour mieux définir le rôle des animaux, de compagnie en particulier mais aussi de la faune sauvage, dans l'émergence des infections à *C. ulcerans* (voir partie projets).

International. Nous poursuivrons nos collaborations ponctuelles avec divers partenaires internationaux (Centres OMS ou pays touchés par des épidémies) pour aider à la surveillance de la diphtérie. Un de nos projets est de relancer un réseau européen, ou international, autour de la surveillance génomique de la diphtérie.

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

Nous continuerons à surveiller l'apparition d'isolats résistants. L'antibiogramme continuera à être réalisé systématiquement sur les souches analysées au CNR. L'analyse génomique systématique des souches permettra de caractériser les gènes impliqués dans la résistance. Les seuils critiques/ECOFFs sont en cours de définition en collaboration avec l'EUCAST (voir ci-dessus).

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

Nous continuerons à alerter Santé Publique France dès que nous détecterons des cas groupés ou des émergences particulières et les investiguerons en partenariat.

7.5.4 Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux

Comme indiqué au point 7.1.1, nous essayerons de motiver nos laboratoires homologues à (re)créer un réseau international de laboratoires de référence, l'idéal étant bien entendu un réseau plus étendu combinant laboratoires de référence et épidémiologistes. Nous y apporterons notre expertise en méthode de référence et notre spécificité concernant les applications du séquençage génomique à l'identification, la détection et la surveillance épidémiologique.

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

- **Portage de *Corynebacterium ulcerans* chez les animaux de compagnie**

C. ulcerans est reconnu comme une cause émergente de diphtérie, à transmission zoonotique. Les souches portant la toxine peuvent produire des tableaux cliniques similaires à *C. diphtheriae tox+* ainsi que des syndromes inflammatoires locaux sévères cutanés attribués à la production d'une phospholipase. La définition de cas de diphtérie utilisée pour la déclaration obligatoire (DO) a ainsi été élargie en 2003 aux *C. ulcerans tox+*. Lorsqu'un cas humain à *C. ulcerans* est déclaré, une série de mesures de contrôle est mise en place pour identifier d'autres cas co-exposés et surtout identifier le ou les animaux potentiellement à l'origine de l'infection. Une investigation vétérinaire est alors nécessaire mais rarement mise en place du fait d'absence de réglementation concernant la conduite à tenir face à cette infection chez l'animal et d'un besoin de connaissances supplémentaires permettant de définir des recommandations appropriées. Afin de mieux définir la prévalence et les facteurs de risque de portage chez les chiens et les chats, une étude ont été initiée lors du mandat

précédent en collaboration avec Santé Publique France et des collègues vétérinaires pour évaluer la fréquence du portage asymptomatique chez les animaux de compagnie). Ce projet sera finalisé prochainement.

- **Autres projets en Santé animale**

D'autres projets de collaborations avec des collègues en Santé animale seront développés afin de caractériser les souches cliniques animales et mieux comprendre le rôle des animaux dans l'écologie et l'épidémiologie des corynébactéries du complexe *diphtheriae*. Des contacts ont été pris avec le réseau Résapath (J.-Y. Madec, ANSES, Lyon) et les collègues vétérinaire de l'ENVA (Maisons-Alfort) et du CEDAF (Centre d'accueil De La Faune Sauvage).

7.6 CONTRIBUTION A L'ALERTE

Nous poursuivons notre implication dans les alertes en cas de détection d'une souche *tox*-positive. Pour rappel, il y a eu de l'ordre de 250 alertes sur la période 2017-2021. Lorsque le CNR détectera la présence du gène *tox*, il contactera systématiquement Santé Publique France par courriel, simultanément à l'envoi des résultats au laboratoire expéditeur.

Les alertes sont réalisées selon les recommandations du HCSP indiquées dans les documents de référence : conduite à tenir, édition de 2011, et son complément de 2021, dont les liens sont donnés sur le site web du CNR.

Comme c'est déjà le cas, lors d'une demande d'analyse d'une souche du complexe *diphtheriae* au CNR, le laboratoire expéditeur de la souche devra compléter une fiche de renseignement sur laquelle sont collectées des informations cliniques ainsi que des données sur le mode de vie du patient (présence d'animaux, voyages...). Ces données seront utiles dans le contexte de l'alerte.

De plus, une mise en relation des cliniciens en charge des patients avec nos référents cliniques est réalisée afin d'aider à la prise en charge et de déterminer la pertinence des mesures thérapeutiques (utilisation de la sérothérapie anti-toxinique).

ANNEXE 1 : PROCESSUS QUALITE

CONTEXTE GENERAL

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

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

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

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

La suite de cette partie a été supprimée du rapport public

ANNEXE 2 : ORGANISATION DES CNR A L'INSTITUT PASTEUR

Cette partie a été supprimée du rapport public



LISTE DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
AP-HP	Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
ARS	Agence régionale de Santé
C2RT	Centre de Ressources et Recherches Technologiques
CCOMS	Centre Collaborateur de l'Organisation Mondiale de la Santé
CCR	Coordination des Centres de Référence
CIBU	Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence
CNBM	Commission Nationale de Biologie Médicale
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CNR	Centre National de Référence
COFRAC	Comité français d'Accréditation
CRBIP	Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur
CNOM	Conseil National de l'Ordre des Médecins
CNOP	Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens
CRBIP	Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur
CRF	Case Report Form
DGA	Directeur Général Adjoint
DF	Direction Financière
DGS	Direction Générale de la Santé
DJ	Direction Juridique
DM	Direction Médicale
DMDIV	Dispositifs Médicaux de Diagnostic In Vitro
DRH	Direction des Ressources Humaines
DRTE	Direction des Ressources Techniques et de l'Environnement
DSI	Direction des Systèmes d'Information
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EMERGEN	Consortium pour la surveillance et la recherche sur les infections à pathogènes EMERgents via la GENomique microbienne
GBEA	Guide de bonne Exécution des Analyses
GBUI	Guide de Bonne Utilisation de l'Informatique
GISAID	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data
GWAS	Genome Wide Association Study
IFB	Institut Français de Bioinformatique
LDAP	Lightweight Directory Access Protocol
LREMS	Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site
LuLISA	Luciferase-Linked Immunosorbent Assay
MALDI-TOF	Spectromètre de masse à temps de vol (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight)
MOT	Micro-Organisme et Toxine (hautement pathogène)
MTA	Material Transfer Agreement
MSSanté	Système de messageries électroniques réservé aux professionnels de santé
NGS	Next-Generation Sequencing

OGM	Organisme génétiquement modifié
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P2M	Plateforme de Microbiologie Mutualisée
PFBMI	Plateforme de Biophysique des Interactions Moléculaires
PFDiag	Plateforme d'Innovation et de Développement de Tests Diagnostiques
PFIA	Plateforme d'ingénierie d'anticorps
PFP3R	Plateformes de Production et Purification de Protéines Recombinantes
PSSI	Politique de Sécurité des Systèmes d'Information
RGPD	Règlement Général sur la Protection des Données
RPPS	Répertoire Partagé des Professionnels de Santé
SAM	Système d'Astreintes microbiologiques
SIL	Système informatique de Laboratoire
SPF	Santé publique France
SPR	Service de Prévention des Risques
VIR	Virus des Infections Respiratoires (CNR VIR)
USDA	United States Department of Agriculture
UTechS	Unités de Technologie et de Service

DOCUMENT SUPPLEMENTAIRE : GESTION DES CONFLITS D'INTERET

Guide pratique

« Prévenir et gérer les conflits d'intérêts au sein des Centres nationaux de référence et de la Cellule d'intervention biologique d'urgence de l'Institut Pasteur »

Cette partie a été supprimée du rapport public