

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2025

Année d'exercice 2024

CNR des Corynébactéries du complexe *diphtheriae*

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	Unité Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes / Institut Pasteur	Pr Sylvain BRISSE

TABLE DES MATIERES

Résumé analytique et Faits marquants 2024	5
Executive summary with year 2024 Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
1.1. Mission et Organisation	7
1.2. Démarche Qualité.....	7
2. Activités d'expertise	9
2.1. Evolution des techniques	10
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	11
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires	11
2.4. Collections de matériel biologique	11
2.5. Activités d'expertise	11
2.6. Activités de séquençage.....	12
2.7. Partage de séquences produites par les CNR.....	13
3. Activités de surveillance	14
3.1. Description du réseau de partenaires	14
3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	14
3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	23
3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	25
3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	26
4. Alertes	27
4.1. Cas groupés ou phénomènes anormaux.....	27
4.2. Nombre d'alertes	27
4.3. Sollicitations et aide à la décision	27
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	28
5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	28
5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires	29
5.3. Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...).....	29
5.4. Activité de formation.....	29
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	30
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	30

6.2. Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	33
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	35
a. Coopération avec les laboratoires de santé animale	35
b. Coopération avec les laboratoires de sécurité sanitaire des aliments ou environnementaux	35
8. Programme d'activité pour les années suivantes	36
a. Développement d'un test de diagnostic rapide (détection de la toxine)	36
b. Microbiologie de <i>Corynebacterium ramonii</i>	36
c. Test de toxigénicité contre les cellules VERO	36
d. Taxonomie des souches basée sur les LIN codes.....	36
e. Amélioration du test d'Elek.....	36
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	37
1.1. Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	37
1.1.1. Expertise	37
1.1.2. Conseil	37
1.1.3. Contribution à la surveillance épidémiologique.....	37
1.1.4. Alerte.....	37
1.2. Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	37
1.3. Locaux et équipements	38
1.4. Collections de matériel biologique	38
1.5. Démarche qualité du laboratoire.....	38
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	39
2.1. Liste des techniques de référence.....	39
2.2. Liste des techniques recommandées par le CNR.....	40
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	41
4. Annexe 4 : Recensement des collections de matériels biologiques	42

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.

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. 2025. Rapport d'Activité du Centre national de Référence es Corynébactéries du complexe diphtheriae – 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.

Résumé analytique et Faits marquants en 2024

Le CNR analyse en urgence, pour les laboratoires de France, les souches de *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans* et d'autres espèces du complexe *diphtheriae*, potentiellement porteuses du gène de la toxine diphtérique. Il surveille la diphtérie, une maladie à déclaration obligatoire, alerte les autorités sanitaires lorsque nécessaire et conseille les professionnels de santé sur cette maladie.

En 2024, le CNR a analysé 324 échantillons, dont 288 isolats et 36 prélèvements cliniques. Trente-trois isolats de *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* (*tox+*) ont été détectés, correspondant à 23 cas d'infections humaines et 10 cas d'infections chez des chevaux. De plus, 59 *C. ulcerans tox+* ont été identifiés, dont 21 chez l'homme et 38 chez des animaux (chiens, chats, chevaux, singes et rats).

Parmi les 23 isolats de *C. diphtheriae tox+* d'origine humaine, 20 ont été détectés en France métropolitaine, la provenance d'un pays étranger a pu être confirmée pour huit d'entre eux. En revanche, tous les *C. ulcerans tox+* sont d'origine autochtone.

Le CNR alerte systématiquement SpF et les ARS concernées en cas de détection du gène de la toxine diphtérique. En 2024, 89 alertes ont été réalisées, dont 40 correspondent à des souches isolées chez l'homme.

L'analyse de la résistance aux antimicrobiens montre que, même si les souches analysées en 2024 restent largement sensibles aux antibiotiques utilisés en première intention, quelques souches résistantes à ces agents et/ou multirésistantes sont observées, souvent liées à un voyage en Afrique.

En 2024, le CNR a finalisé et/ou publié 4 études liées à ses missions, incluant : une étude rétrospective des cas d'infections à *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* en Guyane française, une étude d'un cas de polyneuropathie diphtérique à Mayotte, une définition des seuils critiques pour l'interprétation des antibiogrammes, et une étude observationnelle rétrospective sur les formes cutanées en France métropolitaine. Les avancées techniques réalisées comprennent une amélioration du test d'Elek, et le développement d'un système de génotypage cgMLST pour *C. ulcerans*.

Témoignant de sa visibilité internationale, en 2024 le CNR a été nommé laboratoire Européen de Référence pour la coqueluche et la diphtérie (EURL-PH-DIPE), conjointement à 3 autres laboratoires en Belgique, Allemagne et Finlande.

Executive summary, with year 2024 Highlights

The CNR carries out the rapid analysis of *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans* and other species of the *diphtheriae* complex, potentially carrying the diphtheria toxin gene, for laboratories in France. It monitors diphtheria, a notifiable disease, alerts health authorities when necessary, and advises healthcare professionals on the disease.

In 2024, the CNR analyzed 324 samples, including 288 isolates and 36 clinical samples. Thirty-three *C. diphtheriae* isolates carrying the *tox* gene (*tox*+) were detected, corresponding to 23 cases of human infection and 10 cases of infection in horses. In addition, 59 *tox*+ *C. ulcerans* were identified, 21 in humans and 38 in animals (dogs, cats, horses, monkeys and rats).

Of the 23 *C. diphtheriae tox*+ isolates of human origin, 20 were detected in mainland France, and a foreign origin could be confirmed for eight of them. In contrast, all *tox*+ *C. ulcerans* are of indigenous origin.

The CNR systematically alerts SpF and the ARS in the event of detection of the diphtheria toxin gene. In 2024, 89 alerts were issued, 40 of which concerned strains isolated in humans.

Analysis of antimicrobial resistance shows that, although the strains analyzed in 2024 remain largely susceptible to the antibiotics used as first-line treatment, a few strains resistant to these agents and/or multi-resistant are observed, often linked to travel to Africa.

In 2024, the CNR finalized and/or published 4 studies related to its missions, including: a retrospective study of cases of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* infections in French Guyana, a study of a case of diphtheria polyneuropathy in Mayotte, a definition of critical thresholds for the interpretation of antibiograms, and a retrospective observational study of cutaneous forms in metropolitan France. Technical advances include an improved Elek test, and the development of a cgMLST genotyping system for *C. ulcerans*.

Testifying to its international visibility, in 2024 the CNR was named European Reference Laboratory for Pertussis and Diphtheria (EURL-PH-DIPE), together with 3 other laboratories in Belgium, Germany and Finland.

1. Missions et organisation du CNR

1.1. Mission et Organisation

Les missions générales du Centre National de Référence des Corynébactéries du complexe *diphtheriae* (CNR), comprennent l'expertise, le conseil, la surveillance et l'alerte. Les missions sont détaillées plus spécifiquement en annexe 1.

1.2. Démarche Qualité

Le CNR des Corynébactéries du complexe *diphtheriae* fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 15. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

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

- la Direction de la Responsabilité Sociétale et Environnementale et des Ressources Techniques et son Service Qualité, qui apportent 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.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Les services supports critiques sont régulièrement audités dans le cadre de leurs activités en interne mais également par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation ainsi que les sites et la portée sont disponibles sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

Pour le CNR des Corynébactéries du complexe *diphtheriae*, la technique accréditée est : « Identification des corynébactéries du complexe *diphtheriae* et détection du gène *tox* par PCR multiplex en temps réel »

L'ensemble des CNR/CIBU participent annuellement à des Contrôles de la Qualité Externes (CQE). Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou

mondiaux. Dans le cas où cette organisation est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle afin de maintenir les compétences du personnel et du laboratoire ou une revue poussée des contrôles qualité interne comme peut l'indiquer la procédure générale de gestion des contrôles externes et internes des CNR de l'Institut Pasteur.

L'année Qualité 2024 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Revue qualité	23/04/2024
Revue de direction LREMS	24/06/2024
Audits internes qualité et technique	Pas d'AIT en 2024 AIQ le 18/12/2024
Audit de surveillance COFRAC	Pas d'évaluation en 2024
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	Non applicable

Lors de l'évaluation COFRAC de novembre 2023, les évaluateurs ont accordé leur confiance au LREMS qui a démontré lors de son évaluation une réponse aux exigences qualité et techniques de la norme ISO 15189 v 2012.

Perspectives 2025

En 2025, le LREMS effectue sa transition vers la version 2022 de la norme ISO 15189. Un plan de transition a été établi par le service Qualité et il sera déployé tout au long de l'année 2025 au sein des CNR.

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	18 mars 2025
Audits internes qualité et technique	Juin - décembre 2025
Revue de direction LRE-MS	A planifier
Audit de renouvellement, de transition et d'extension COFRAC	du 14 au 18 avril 2025 sur les sites de Paris et Lyon

Participation du CNR à un contrôle qualité externe

Pour les corynébactéries du complexe *diphtheriae*, il n'existe pas de CQE commercial. De ce fait, le CNR réalise annuellement un CQE avec le Laboratoire de Microbiologie à Bruxelles (LMB ; National Reference Center for Toxigenic Corynebacteria, Department of Microbiology and Infection Control, Universitair Ziekenhuis Brussel, Vrije Universiteit Brussel, Bruxelles, Belgique).

En décembre 2024 le LMB nous a envoyé 6 échantillons à analyser. Les analyses ont consisté à cultiver les échantillons et extraire leur ADN, puis à faire la qPCR accréditée, qui cible le gène *tox* et le gène *rpoB*. Les résultats ont tous été corrects. Dans un deuxième temps, le test d'Elek qui détecte la production de la toxine diphtérique a été réalisé sur les

isolats tox-positifs. Tous les résultats ont été corrects.

Enfin, nous avons également réalisé avec succès les tests biochimiques pour déterminer le biovar pour les isolats appartenant à l'espèce *C. diphtheriae*.

En conclusion, **tous les résultats des échantillons de CQE analysés pour l'année 2024 ont été conformes aux résultats attendus.**

En parallèle, nous avons envoyé 6 autres échantillons à analyser au LMB. Ce laboratoire a obtenu 100% de résultats conformes, ce qui constitue une autre confirmation, indirecte, de l'exactitude et de la qualité de nos analyses.

Liste des examens de biologie médicale pratiqués par le CNR des corynébactéries du complexe *diphtheriae*

CNR	Famille	Sous famille	Activités de biologie médicale	Nb analyse 2024	Accrédité A ou Non Accrédité NA
CNR des corynébactéries du complexe <i>diphtheriae</i>	Microbiologie	Bactériologie	Détection du gène de la toxine diphtérique et identification de corynébactéries appartenant au complexe <i>diphtheriae</i>	178	A
	Microbiologie	Bactériologie	Test d'Elek (production de la toxine in-vitro)	38	NA
	Microbiologie	Bactériologie	Biotypage	87	NA
	Microbiologie	Bactériologie	Antibiogrammes	123	NA
	Microbiologie	Bactériologie	Séquençage génomique	123	NA

2. Activités d'expertise

Chiffres clés :

En 2024, 18 cas cliniques d'infections humaines et 9 cas d'infections chez des chevaux, dus à des souches de *C. diphtheriae* porteuses du gène *tox* (tox+), ont été rapportés.

Par ailleurs, 57 cas cliniques d'infections humaines et 14 cas d'infections chez des animaux (chats, chiens et chevaux), dus à des souches de *C. diphtheriae* tox-, ont été observé.

Parmi les cas d'infections humaines dus à *C. diphtheriae* porteuses du gène *tox* (tox+), 15 correspondaient à des souches isolées en France métropolitaine, 1 à La Réunion et 2 à Mayotte. Huit des 15 cas renseignés étaient des infections importées depuis l'étranger.

De plus, 20 cas cliniques d'infections humaines et 38 cas d'infections chez des animaux (chats, chiens, chevaux, rats

et singes), dus à des souches de *C. ulcerans* tox+, ont été rapportés.

Enfin, 50 cas de *C. ulcerans* tox- ont été observés, dont 15 chez l'homme et 34 chez des animaux (chats, chiens, chevaux).

A l'exception d'une souche *C. ulcerans* tox- isolée à La Réunion, toutes les *C. ulcerans* isolées en 2024 sont des souches autochtones.

2.1. Evolution des techniques

2.1.1. Amélioration du test d'Elek.

Le test d'Elek est un test d'immunoprécipitation qui permet de mettre en évidence la production de la toxine diphtérique chez les isolats porteurs du gène *tox*. Dans notre collection il y avait des isolats porteurs du gène *tox* pour lesquels le test d'Elek était négatif. Des souches similaires ont été décrites dans la littérature et sont nommées NTTB pour « non-toxigenic toxin-gene-bearing ». Toutefois, aucune mutation n'avait été détectée au niveau du gène *tox* ou en amont sur les souches NTTB du CNR. Cette observation a suggéré la possibilité d'un manque de sensibilité du test d'Elek, menant à ne pas observer la production de la toxine chez certaines souches.

Nous avons donc testé des modifications de la procédure du test d'Elek au niveau de : la quantité de l'inoculum bactérien utilisé (nous avons augmenté la quantité), la distance entre le point d'inoculation des souches sur la gélose d'Elek et le disque imprégné d'anti-toxine (nous avons réduit la distance) ainsi qu'au niveau de la concentration d'antitoxine utilisée (nous avons augmenté la concentration).

Ces modifications ont permis de mettre en évidence la production de la toxine diphtérique chez 9 souches *C. diphtheriae* et 39 souches *C. ulcerans* qui avaient été auparavant considérées comme des souches NTTB. Une note décrivant la modification du test d'Elek est en cours de rédaction.

2.1.2. Développement d'un système de génotypage cgMLST pour *C. ulcerans*

Un projet visant à développer une méthode de génotypage cgMLST pour *C. ulcerans*, agent zoonotique de la diphtérie, a été mené à bien en 2024, et un manuscrit a été soumis pour publication. Il est également posté sur bioRxiv : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.22.609154v1>

Le schéma cgMLST combine 1 628 loci et présente une résolution élevée pour le sous-typage des souches.

Ce développement est détaillé en section 6.1.2 et a permis de présenter en section 3, les résultats de génotypage des souches de *C. ulcerans* sur la base des séquences génomiques.

2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

En 2025, nous n'avons pas évalué de techniques, réactifs ou trousse diagnostiques. Nous avons en projet d'évaluer la trousse « AmpliSens *Corynebacterium diphtheriae* / tox-genes-FRT PCR kit », pour la détection du gène *tox* et l'identification des bactéries du complexe *diphtheriae*. Malheureusement, pour des raisons de coût du processus administratif d'obtention du kit, nous avons abandonné ce projet.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

En 2024 nous avons transféré notre mode opératoire (qPCR *tox* et espèces) vers l'unité Bactériologie du Centre de Recherche Médicale Sanitaire (CERMES) du Niger, à sa demande.

2.4. Collections de matériel biologique

La collection du CNR s'est enrichie de 245 nouveaux isolats, dont les sources sont détaillées dans un tableau « Nombre d'isolats par espèce et origine géographique » dans le point 3.2. Voir annexe 4 pour un état complet de la collection.

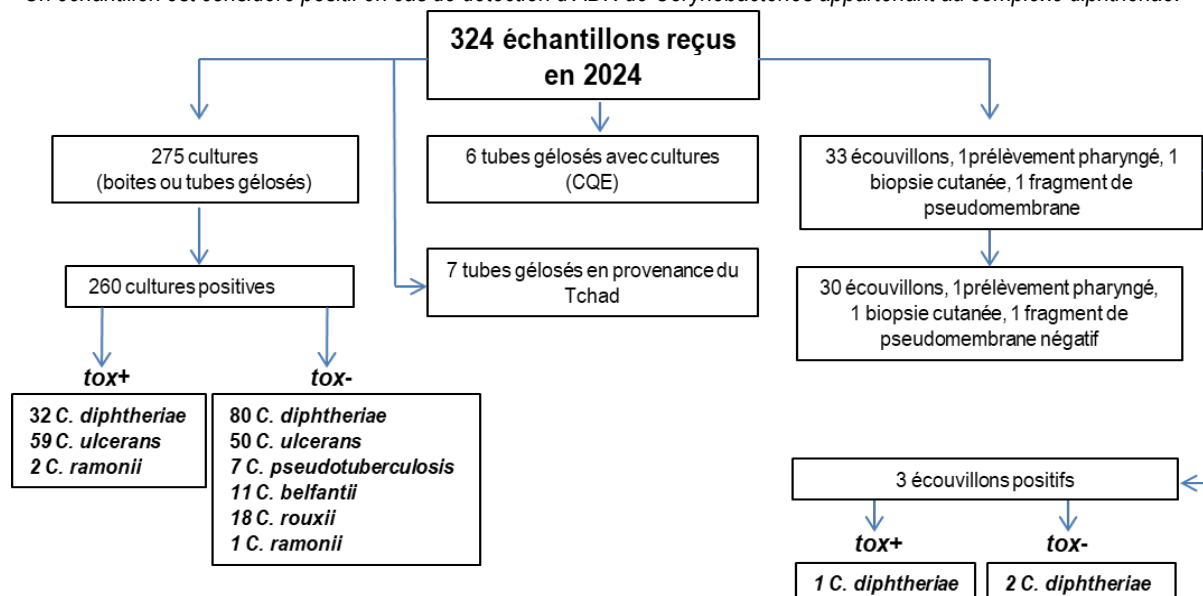
2.5. Activités d'expertise

En 2024, nous avons reçu (hors CEQ et isolats en provenance du Tchad), 311 échantillons ou souches à analyser (Figure et Tableau ci-dessous) :

- 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.

Figure : Nombre d'échantillons analysés par le CNR en 2024

Un échantillon est considéré positif en cas de détection d'ADN de *Corynebactéries* appartenant au complexe *diphtheriae*.



Le délai maximum de restitution des résultats du CNR aux laboratoires est indiqué, par analyse, dans le tableau ci-

dessous.

Tableau : Analyses d'échantillons non dédoublonnés, réalisées au CNR et délai maximum de restitution des résultats

Type d'échantillon	Type d'analyse	Nombre d'analyses	Délai de rendu des résultats
Prélèvements	Réception et mise en culture	36	Non applicable
Prélèvements	Analyse du gène tox et détection d'ADN de <i>C. diphtheriae</i> / <i>C. belfantii</i> / <i>C. rouxii</i> ou <i>C. ulcerans</i> / <i>C. pseudotuberculosis</i> par qPCR	36	< 2 jours ouvrés ; Typiquement le jour même
Isolats bactériens	Réception et mise en culture	275	Non applicable
Isolats bactériens	Analyse du gène tox et détection d'ADN de <i>C. diphtheriae</i> / <i>C. belfantii</i> / <i>C. rouxii</i> ou <i>C. ulcerans</i> / <i>C. pseudotuberculosis</i> par qPCR	275	< 2 jours ouvrés ; Typiquement le jour même
Isolats bactériens	Test d'Elek (production de la toxine in-vitro)	94	Non rendu systématiquement
Isolats bactériens	Biotypage	142	Non rendu systématiquement
Isolats bactériens	Antibiogrammes	245	Non rendu systématiquement
Isolats bactériens	Séquençage génomique	245	Non rendu systématiquement

2.6. Activités de séquençage

Le CNR a-t-il eu accès à une plate-forme de séquençage ?

Le CNR a accès à la Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) de l'Institut Pasteur. La technologie Illumina sur séquenceur NextSeq-500 est utilisée ; les bibliothèques sont préparées avec le kit Nextera XT.

Le CNR réalise également sur place, des séquençages Oxford Nanopore Technologies selon les besoins.

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

Le CNR bénéficie de l'expertise de bio-informaticiens du Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur, qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données brutes sortantes. Nous utilisons de plus une combinaison d'outils bioinformatiques en ligne de commande UNIX et en interface graphique. Les outils les plus utilisés sont des scripts développés dans l'unité BEBP et la plateforme BIGSdb (pour le génotypage MLST et cgMLST).

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

Le CNR utilise les séquences génomiques à des fins de santé publique : appui à la définition de cas groupés ou détection *de-novo* (rétrospectivement) de cas groupés, gènes de résistance aux antibiotiques, explication du caractère NTTB.

Ces analyses ont lieu essentiellement rétrospectivement, permettant de comprendre les liens entre cas, mais jusqu'à présent ne sont pas utilisées pour des actions spécifiques de contrôle des infections, qui ont lieu de toute façon selon les recommandations en vigueur dès qu'un cas est détecté (screening des contacts, antibioprophylaxie). Par exemple, le CNR a alerté SpF sur la circulation en 2024, de génotypes déjà identifiés en 2023 dans l'évènement Européen lié à des populations migrantes, suggérant une persistance de ces souches en France

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles) :

Les génomes sont systématiquement analysés pour préciser l'espèce, par MLST et cgMLST pour définir la clonalité (en première ligne), recherche de gènes de virulence (dont la toxine diphtérique, en complément de la qPCR) et gènes de résistance (dont *ermX* et *pbp2m*, en première ligne). L'unité BEBP hébergeant le CNR a développé un pipeline d'analyse (appelé *diphtOscan* ; Hennart *et al.* 2023, Peer Comm. J) qui automatise ces recherches.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Le séquençage permet de confirmer des cas groupés ou de les détecter (« clusters cryptiques »).

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Nombre de souches séquencées dans l'année 2024 : 245.

Nous séquençons tous les isolats appartenant au complexe *diphtheriae* analysés au CNR, hors exceptions (épidémies monoclonales de souches animales).

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences : génomes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Nous déposons dans un premier temps, à des fins d'analyse, toutes les séquences assemblées dans notre plateforme BIGSdb privée. Celles-ci sont rendues publiques ultérieurement depuis cette base de données et sont déposées en parallèle dans les bases de données de séquences (ENA) à l'occasion de publications, ou en amont de celles-ci lorsque la situation épidémiologique le requiert. Les séquences brutes sont déposées au format fastq dans SRA, et les assemblages sont rendus publics via BIGSdb-Pasteur; dans ces cas, quelques données contextuelles sont fournies.

2.7. Partage de séquences produites par les CNR

Nous déposons les séquences brutes au format fastq dans ENA, et les assemblages sont rendus publics via la plateforme BIGSdb-Pasteur (<https://bigbdb.pasteur.fr/diphtheria/>). Elles sont partagées à des fins de santé publique ou avec nos collaborateurs.

3. Activités de surveillance

En 2024, 123 souches obtenus à partir de cas cliniques humains et 122 souches obtenues à partir de cas vétérinaires ont été analysées :

- 27 *C. diphtheriae* tox+, dont 18 cas cliniques humains et 9 cas vétérinaires. Pour 8 des 15 cas humains détectés en métropole, leur importation depuis l'étranger a pu être vérifiée.
- *C. ulcerans* tox+ a été identifié dans 20 cas cliniques humains et dans 38 cas vétérinaires.
- *C. diphtheriae* tox- a été détecté 71 fois : 57 cas humains et 14 cas vétérinaires.
- *C. ulcerans* tox- a été isolé dans 16 cas cliniques humains et 34 cas vétérinaires.
- *C. pseudotuberculosis* tox- a été détecté 7 fois, tous vétérinaires
- *C. ramonii* tox+ a été détecté dans 2 cas vétérinaires
- *C. ramonii* tox- a été détecté dans 1 cas vétérinaire
- *C. belfantii* tox- a été détecté 11 fois, tous dans des cas humains
- *C. rouxii* tox- a été détecté dans 1 cas humain et 17 cas vétérinaires

Les souches de ces deux dernières nouvelles espèces analysées cette année confirment leur caractère non-toxinogène systématique.

3.1. Description du réseau de partenaires

Il n'y a pas de réseau de partenaires structuré 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 Corynébactérie du complexe *diphtheriae*, le laboratoire expéditeur de la souche complète la fiche de renseignements afin de collecter les informations cliniques pertinentes (y compris présence d'animaux, voyages...). Ces fiches constituent une base importante pour la surveillance de la diphtérie en France.

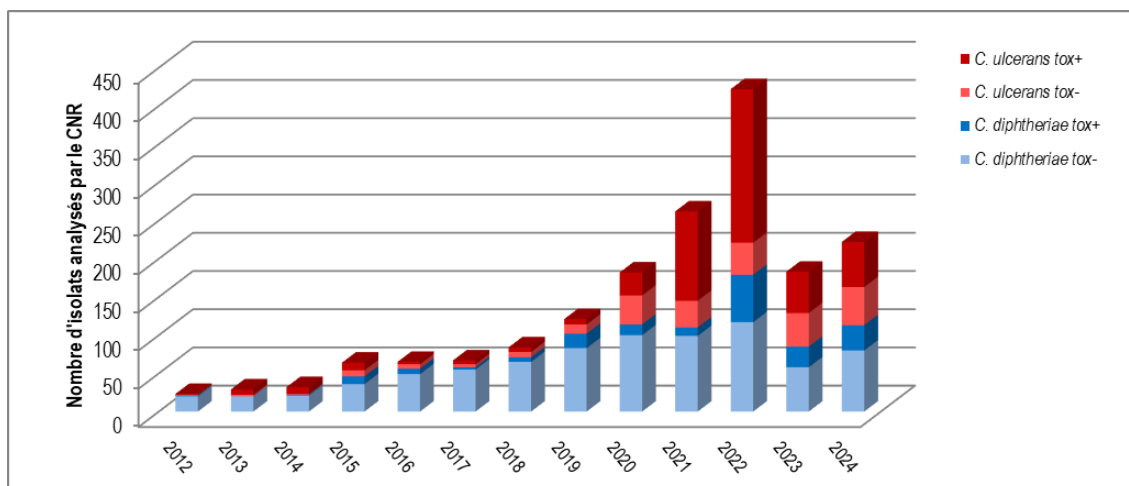
En 2024, **112 correspondants distincts nous ont envoyé des échantillons** à analyser.

3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Évolution temporelle

La figure ci-dessous montre que le nombre d'isolats de *C. diphtheriae* analysés en 2024 a légèrement augmenté par rapport à 2023, mais est plus faible qu'en 2022, qui avait été marquée pour une épidémie chez des populations de migrants. Le nombre de *C. ulcerans* analysés est stable par rapport à 2023, et plus faible qu'en 2022, année où une épidémie animale à *C. ulcerans* tox+ avait été détectée.

Figure : Analyse temporelle du nombre d'isolats analysés au CNR-CCd entre 2012 et 2024

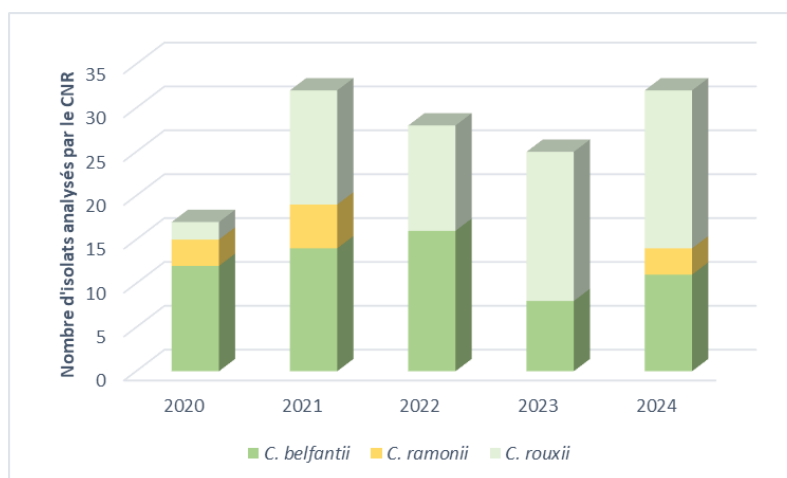


En ce qui concerne les autres espèces du complexe *diphtheriae*, la figure ci-dessous montre le nombre d'isolats analysés entre 2020 et 2024. Le nombre des *C. rouxii* reste stable en 2024 par rapport à 2023. Une légère augmentation du nombre d'isolats de *C. belfantii* a eu lieu en 2024, de même que pour les isolats appartenant à l'espèce *C. ramonii*.

Tous les *C. rouxii* analysés entre 2020 et 2024 ont été isolés en France métropolitaine, en majorité à partir de prélèvements vétérinaires (57 sur 61 ; 93%). En ce qui concerne les *C. ramonii* (N= 11), 8 ont été isolés à partir de prélèvements humains et 3 à partir de prélèvements vétérinaires. En revanche, tous les *C. belfantii* (N= 61) ont été isolés à partir de prélèvements humains. Les *C. belfantii* ont été isolés en France métropolitaine tandis que 3 *C. ramonii* (tox-négatifs) ont été isolés en Guyane.

Parmi les souches de ces trois nouvelles espèces, seules 6 *C. ramonii* sont tox-positives et Elek positives, dont 5 isolées en région Auvergne-Rhône-Alpes (4 en 2021 et 1 en 2024), et 1 isolée en Bretagne en 2024.

Analyse temporelle du nombre d'isolats de *C. belfantii*, *C. ramonii* et *C. rouxii* par le CNR entre 2020 et 2024



Origines géographiques

Le tableau ci-dessous résume les origines géographiques des isolats et les espèces impliquées. On note que les isolats ont été détectés en majorité en France métropolitaine, avec Mayotte en seconde position. Les *C. ulcerans* sont métropolitains à une seule exception.

Tableau : Nombre d'isolats de l'année 2024, par espèce et origine géographique

	Métropole (humain)	Métropole (animal)	Guyane (humain)	La Réunion (humain)	Mayotte (humain)	Nouvelle Calédonie (humain)	Polynésie (humain)	Total
A. Isolats tox positifs								
<i>C. diphtheriae</i>	15	9	0	1	2	0	0	27
<i>C. ulcerans</i>	20	38	0	0	0	0	0	58
<i>C. belfantii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. rouxii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. pseudotuberculosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. ramonii</i>	0	2	0	0	0	0	0	2
Total	35	49	0	1	2	0	0	87
B. Isolats tox négatifs								
<i>C. diphtheriae</i>	39	14	2	1	14	0	1	71
<i>C. ulcerans</i>	15	34	0	1	0	0	0	50
<i>C. belfantii</i>	11	0	0	0	0	0	0	11
<i>C. rouxii</i>	1	17	0	0	0	0	0	18
<i>C. pseudotuberculosis</i>	0	7	0	0	0	0	0	7
<i>C. ramonii</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
Total	66	73	2	2	14	0	1	158
TOTAL (A + B)	101	122	2	3	16	0	1	245

Caractéristiques cliniques

Le tableau suivant résume les caractéristiques cliniques des 75 cas cliniques (dédoublonnés) de *C. diphtheriae* et 36 cas de *C. ulcerans* humains pour lesquels les données étaient accessibles.

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

Une notion de voyage précédant l'infection à *C. diphtheriae* est détectée en métropole, chez les cas tox+ comme chez les cas tox-.

Les origines des prélèvements cliniques sont peu différentes entre les deux espèces, avec une large majorité de prélèvements cutanés.

Tableau : Caractéristiques cliniques des cas humains en 2024

Caractéristiques #	<i>C. diphtheriae</i>		<i>C. ulcerans</i>	
	tox-positifs (N= 18)	tox-négatifs (N= 57)	tox-positifs (N= 20)	tox-négatifs (N= 16)
Données démographiques				
Age médian en années (IQR)	41 (11 – 54)	37 (17 – 50)	67 (61 – 74)	70 (63 – 81)
Sexe (% homme)	67	75	65	44
Notion de voyage ## (pour souches Métropole)	8 voyages sur 11 renseignés, 4 NR	22 voyages sur 28 renseignés, 8 NR	0 voyage sur 13 renseignés, 7 NR	0 voyage sur 8 renseignés, 8 NR
Contact avec animaux	0 contact sur 3 renseignés, 15 NR	6 contacts sur 10 renseignés, 47 NR	7 sur 9 renseignés, 11 NR	4 sur 8 renseignés, 8 NR
Origine du prélèvement				
Nombre de patients	18	57	20	16
Cutané (%)	72	82	75	75
Respiratoire (%)	17	9	10	0
Autres* (%)	11	9	15	25

* Oreille, sang, etc. ; NR = Non Renseigné

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

Voyage hors Métropole (Outre-Mer ou Étranger)

***C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* (*tox+*).** En 2024, le CNR a reçu ou isolé 27 *C. diphtheriae* porteurs du gène *tox* chez 27 cas cliniques dédoublonnés. Parmi eux, 24 cas viennent de France métropolitaine, de différentes régions (15 humains et 9 vétérinaires). Parmi les 15 cas humains enregistrés en métropole, la notion de voyage à l'étranger n'a été renseignée que pour 11 cas, dont 8 pour lesquels la notion d'importation a pu être confirmée. Les 3 autres isolats *C. diphtheriae tox+* proviennent de La Réunion (N=1) et Mayotte (N=2). L'âge médian de ces patients est de 41 ans. L'origine clinique des isolats *C. diphtheriae tox+* est majoritairement cutanée (72%).

Les 18 *C. diphtheriae tox+* isolés chez l'homme (100%) sont producteurs de la toxine diphtérique (test d'Elek positif). Pour 17 isolats le biovar est Mitis et pour 1 isolat le biovar est Gravis.

En ce qui concerne les isolats *C. diphtheriae tox+* obtenus à partir de prélèvements vétérinaires, ils ont été tous isolés chez des chevaux. Ces isolats sont tous producteurs de la toxine diphtérique et leur biovar est Gravis.

C. diphtheriae non porteurs du gène *tox* (*tox*-). Les 71 isolats *C. diphtheriae tox*- proviennent en majorité de différentes régions de France métropolitaine (39 humains et 14 vétérinaires), 2 proviennent de Guyane, 14 de Mayotte, 1 de la Polynésie Française et 1 de La Réunion. L'âge médian est de 37 ans, avec 75% des cas de sexe masculin. Comme pour les isolats *tox*+, l'origine clinique des isolats *C. diphtheriae tox*- est majoritairement cutanée (82%).

C. ulcerans porteurs du gène *tox* (*tox*+). En 2024, le CNR a reçu ou isolé 58 *C. ulcerans* porteurs du gène *tox*. Tous les isolats proviennent de France métropolitaine. Vingt isolats ont été obtenus à partir de prélèvements humains et 38 à partir de prélèvements vétérinaires réalisés sur des chats (N=19), des chiens (N=9), des chevaux (N=7), rats (N=1) et singes (N=2).

L'âge médian des patients humains est de 67 ans, avec 65% des cas de sexe masculin. L'origine clinique des isolats *C. ulcerans tox*+ en provenance des isolats humains est majoritairement cutanée (75%). En ce qui concerne les *C. ulcerans tox*+ d'origine animale, ils ont été retrouvés sur des prélèvements d'origine cutanée (54%), suivis par des prélèvements respiratoires (27%), prélèvements d'origine auriculaire (14%) et oculaire (5%). En ce qui concerne les cas humains, le contact proche avec des animaux n'a pu être vérifié que pour 7 cas.

Tous les isolats *C. ulcerans* porteurs du gène *tox* testés sont producteurs de la toxine diphtérique (test d'Elek positif).

C. ulcerans non porteurs du gène *tox* (*tox*-). En 2024 le CNR a reçu ou isolé 50 *C. ulcerans* non porteurs du gène *tox*. Tous les isolats proviennent de France métropolitaine à l'exception d'un isolat en provenance de La Réunion. Seize isolats ont été obtenus à partir de prélèvements humains et 34 à partir de prélèvements vétérinaires réalisés sur des chats (N=10), des chiens (N=20), et chevaux (N=4).

L'âge médian des cas humains est de 70 ans, avec 44% des cas de sexe masculin. L'origine clinique des isolats *C. ulcerans tox*- isolés chez l'homme est majoritairement cutanée (75%). Le contact proche avec des animaux domestiques n'a été renseigné que pour 8 cas, dont 4 en contact. Les isolats vétérinaires sont d'origine cutanée à 44%, respiratoires à 41%, et 15% d'autres sites (yeux, oreilles, tract génital et os).

Diversité génomique des isolats humains de *C. diphtheriae*

L'analyse de génotypage cgMLST (basée sur 1305 gènes) a été effectuée sur 87 isolats obtenus à partir des cas humains, après avoir éliminé les doublons (isolats provenant du même prélèvement effectué le même jour chez un même patient, ou de prélèvements différents prélevés le même jour ou à des jours différents durant maximum 1 mois). Les résultats montrent une grande diversité des souches de *C. diphtheriae* collectées en 2024 (Figure ci-dessous).

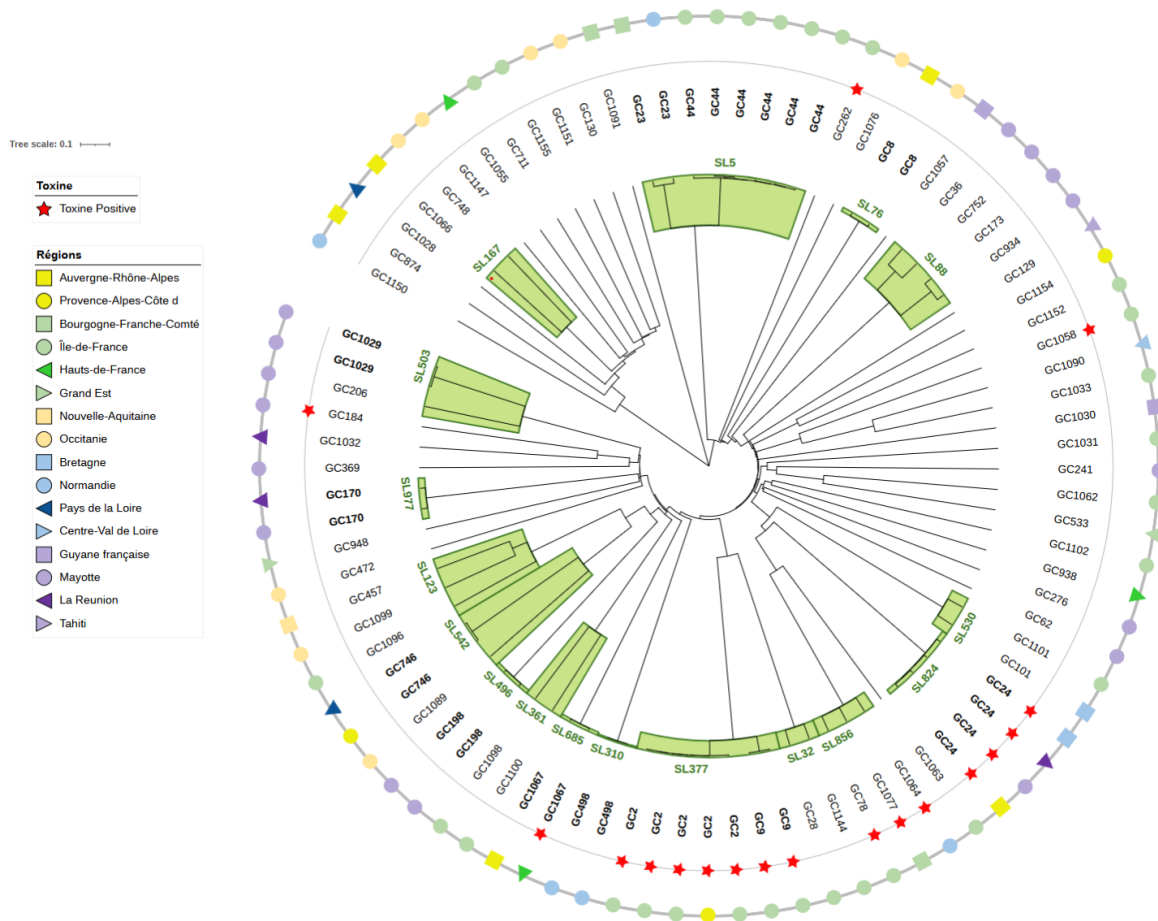


Figure : dendrogramme des souches de *C. diphtheriae*, France, 2024. GC : groupe génétique (ou genetic cluster en anglais, <25 différences alléliques) ; SL : sous-lignée, ou sous-lignée (<500 différences alléliques). Les numéros de SL sont hérités des numéros de ST (MLST 7-gènes) pour une cohérence et continuité nomenclaturale. L'étoile rouge indique que la toxine est produite (test d'Elek). Les symboles externes correspondent aux Régions administratives françaises. Les branches surlignées en vert correspondent aux SL retrouvés plusieurs fois. Les GC retrouvés plusieurs fois sont indiqués en lettres grasses.

Parmi les souches toxigènes, quatre sous-lignées (SL) ont été identifiées. Au sein de ces SL, des groupes génomiques (GC) ont été détectés, suggérant des chaînes de transmission récentes. En effet, ces groupes clonaux affichent une faible diversité génomique, avec seulement 1 à 25 allèles différents en cgMLST.

- SL377 qui avait été impliqué à partir de 2022 dans des cas d'infections, majoritairement cutanées, chez de migrants. En 2024, ce SL est composé de deux GC n'impliquant pas de migrant, mais majoritairement d'isolats provenant d'île de France (essentiellement, Paris) : **GC2** comprenant cinq isolats très similaires génétiquement (1 à 3 différences alléliques) ; quatre sont isolés de la région parisienne et le dernier isolé en Provence-Alpes-Côte-D'azur ; et **GC9** impliquant deux isolats (2 différences alléliques), isolés à Paris.
- SL824 caractérisé depuis 2022 par des souches principalement isolées à Mayotte et à La Réunion ; ses isolats sont tous regroupés dans le **GC24**, composé de quatre isolats (entre 13 et 16 différences alléliques) isolés de Mayotte, de la Réunion, et de cas avec notion de voyage récent au Soudan et aux Comores.

- SL856 correspondant à trois souches n'appartenant pas au même GC, donc moins proches (entre 69 et 70 différences alléliques) dont deux isolats de patients revenant du Sénégal et un d'un patient revenant de Côte d'Ivoire. Ce dernier isolat s'est révélé multirésistant (fluoroquinolones, macrolides et beta-lactamines).
- SL685 caractérisé par le **GC1067** avec deux isolats (8 différences alléliques). Un isolat est non toxigène tandis que l'autre est toxigène et la description clinique informe d'une angine avec la présence d'une pseudomembrane.

Parmi les souches non-toxigènes, on remarque des GC de souches résistantes à plusieurs antibiotiques.

- SL542 comprend des isolats observés depuis 2020, avec voyage au Mali, Sénégal et Sri Lanka. Les isolats de cette lignée présentent des résistances aux beta-lactamines, macrolides et fluoroquinolones. Deux isolats de 2024 appartiennent au **GC746** (4 différences alléliques), sans notion de voyage renseignée.
- SL503 comprend des souches isolées à Mayotte, à partir de 2019 et présentant une résistance à la tétracycline. Trois isolats reçus de Mayotte en 2024 en font partie ; deux appartiennent au **GC1029** (3 différences alléliques).
- SL496 regroupe deux isolats du **GC198** (10 différences alléliques) isolés à Mayotte. Les deux isolats présentent une résistance aux fluoroquinolones.

Diversité génomique des isolats obtenus à partir des cas humains et des cas animaux de *C. ulcerans*

L'analyse de génotypage cgMLST (basée sur 1628 gènes ; Crestani *et al.*, bioRxiv ; doi: <https://doi.org/10.1101/2024.08.22.609154>; voir section 6.1) a été effectuée sur 111 isolats, après avoir éliminé les doublons (isolats provenant du même prélèvement effectué le même jour chez un même patient, ou de prélèvements différents prélevés le même jour ou à des jours différents durant maximum 1 mois). Les 111 souches de *C. ulcerans* séquencées en 2024 montrent une grande diversité génétique (**Figure ci-dessous**).

L'analyse a confirmé un cas de transmission zoonotique et plusieurs cas groupés potentiels, caractérisés par des groupes génétiques (GC) qui détectent des transmissions potentielles par la similarité génomique.

Tree scale: 0.1

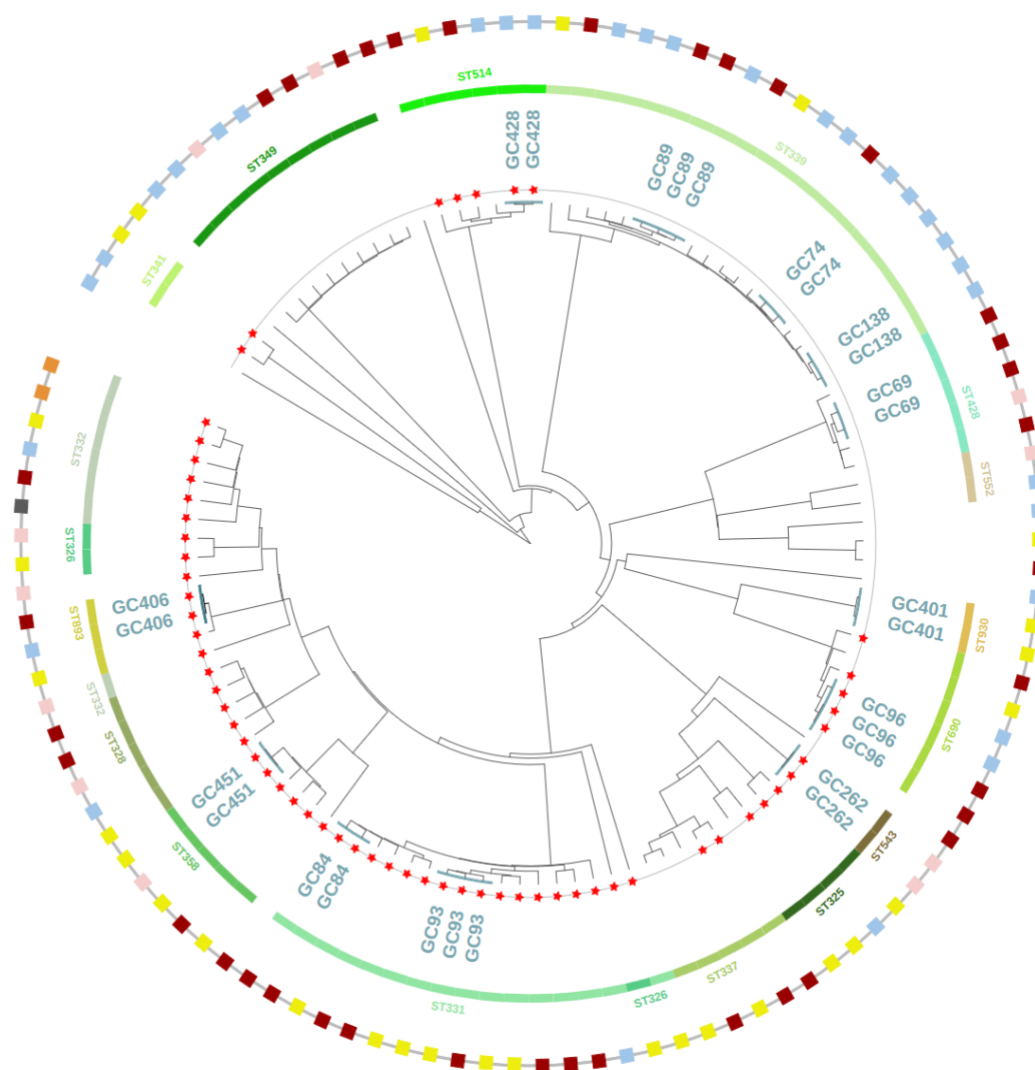


Figure : dendrogramme des souches de *C. ulcerans*, 2024. GC : groupe génétique (ou genetic cluster en anglais, <25 différences alléliques). A noter, ces groupes sont créés par single linkage et sont susceptibles d'évoluer lors de l'analyse ultérieure incluant des souches additionnelles. Les isolats d'un même ST (MLST basé sur 7 gènes) sont représentés par des secteurs de couleurs (vert à marron). L'étoile rouge indique que la toxine est produite (Elek-positive). Les carrés du cercle externe correspondent aux hôtes. Les GC retrouvés plusieurs fois sont indiqués en bleu en lettres grasses.

Les groupes d'isolats toxigènes quasi-identiques correspondent à :

- **GC406** du ST893 : regroupant deux isolats (un maître et son chien) isolés dans la région du Grand Est, confirmant une transmission zoonotique (3 différences alléliques). Un isolat de chat du même ST et proche du GC406 (26 allèles cgMLST différents) a été isolé dans la même région en 2024, mais aucun lien avec la paire précédente n'a pu être confirmé.
- **GC451** du ST358 : deux souches, une de chat et une de cheval. Ces souches sont identiques par cgMLST, mais aucun lien épidémiologique n'a pu être confirmé avec les informations transmises au CNR.

- **GC84** du ST331 : une paire d'isolats de deux personnes isolées dans les Hauts-de-France dans des villes différentes (39 allèles cgMLST différents).
- **GC93** du ST331 : trois isolats, un de chat et d'une personne de la région des Hauts de France (23 allèles cgMLST différents) et un de chat, isolé en Normandie (20 allèles cgMLST différents par rapport à l'isolat du chat des Hauts-de-France).
- **GC262** du ST543 : deux isolats de chevaux isolés respectivement en Auvergne-Rhône-Alpes et en Ile-de-France. Ces souches n'ont pas de différence allélique en cgMLST et ont une résistance à la gentamicine, sulfonamides (sul2) et triméthoprim. Le ST543 comprend d'autres souches de chevaux avec la même résistance.
- **GC96** du ST690 : trois isolats, dont deux isolés d'un épisode infectieux d'un même patient (8 mois d'intervalle) isolés en Occitanie (2 allèles cgMLST différents). Un autre isolat de chien en Auvergne-Rhône-Alpes (22 à 24 allèles de cgMLST différents par rapport aux isolats de l'épisode infectieux). Aucun lien n'a pu être confirmé.
- **GC428** du ST514 : Deux souches, isolées de chiens en Ile de France et en Normandie.

Les groupes d'isolats non-toxinogènes quasi-identiques sont représentés par :

- **GC69** du ST428 : le ST428 est majoritairement constitué de souches isolées en région Nouvelle-Aquitaine depuis 2016, comprenant des isolats humains, de chats et de chevaux. En 2024, 4 isolats, dont trois humains et un de cheval, ont été isolés dans cette même région. Deux des trois isolats humains sont dans le GC69 (32 allèles cgMLST différents).
- **GC89** du ST339 : trois isolats ont été identifiés, dont deux provenant de la région Auvergne-Rhône-Alpes (un chien et un humain) issus de villes différentes. Aucun lien n'a pu être établi selon les informations fournies au CNR, malgré leur similarité génétique (17 allèles cgMLST différents). De plus, un isolat provenant d'un patient, dont la souche est proche de celle du chien (20 allèles cgMLST différents), a été isolé en Occitanie.
- **GC401** du ST930 : deux isolats provenant d'un même chat correspondent à un épisode infectieux d'1 mois et demi d'intervalle (7 allèles cgMLST différents).
- **GC138** du ST339 : ce GC comprend 4 souches isolées de chiens de 2020 à 2024 dans différentes régions de France. En 2024, deux souches ont été isolées. Aucun lien n'a pu être identifié (19 allèles cgMLST différents).
- **GC74** de ST339 : deux souches de chien isolées dans la région Grand Est, de villes différentes (34 allèles cgMLST différents).

3.3. 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 du diamètre au-delà critique de sensibilité 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 sur les seuils de sensibilité des corynébactéries proposés en 2024 par l'EUCAST, issues d'une étude coordonnée par le CNR lui-même, en collaboration avec le laboratoire de développement de l'EUCAST et le laboratoire de référence allemand (Berger, Badell, Ahman *et al.*, J Antimicrob Chemotherapy, 2024) ; et à défaut, sur les recommandations CA-SFM 2013.

Le tableau ci-dessous montre le nombre d'isolats résistants aux différents antibiotiques testés pour *C. diphtheriae* ; pour les autres espèces y compris *C. ulcerans*, les isolats restent très majoritairement sensibles. A noter, *C. ulcerans* n'est pas sensible à la clindamycine contrairement à *C. diphtheriae*.

Tableau : *C. diphtheriae* d'origine humaine, résistance aux antibiotiques en 2024

Antibiotiques	<i>C. diphtheriae</i> tox+ (Testés : 18 isolats) Nombre d'isolats R (%)	<i>C. diphtheriae</i> tox- (Testés : 57 isolats) Nombre d'isolats R (%)	Critères d'interprétation
Beta-lactamines			
Pénicilline	1 (6)	7 (13)	EUCAST 2024
Amoxicilline*	Pas de résistance	3 (5)	EUCAST 2024
Oxacilline	1 (6)	7 (13)	CA-SFM, 2013
Céfotaxime	Pas de résistance	1 (2)	EUCAST 2024
Méropénème	Pas de résistance	3 (5)	EUCAST 2024
Cyclines			
Tétracycline	6 (33)	13 (23)	EUCAST 2024
Aminosides			
Gentamicine	15 (83)	49 (86)	CA-SFM/EUCAST, 2019
Macrolides			
Azithromycine	1 (6)	3 (5)	CA-SFM, 2013
Clarithromycine	Pas de résistance	2 (3)	CA-SFM, 2013
Érythromycine	1 (6)	3 (5)	EUCAST 2024
Clindamycine	Pas de résistance	Pas de résistance	EUCAST 2024
Pristinamycine	Pas de résistance	Pas de résistance	CA-SFM, 2013
Spiramycine *	1 (6)	2 (3)	CA-SFM, 2013
Fluoroquinolones			
Ciprofloxacine	3 (17)	7 (13)	EUCAST 2024
Moxifloxacine	1 (6)	6 (10)	CA-SFM, 2013

Tableau : *C. diphtheriae* d'origine humaine, résistance aux antibiotiques en 2024 : Suite

Antibiotiques	<i>C. diphtheriae</i> tox+ (Testés : 18 isolats) Nombre d'isolats R (%)	<i>C. diphtheriae</i> tox- (Testés : 57 isolats) Nombre d'isolats R (%)	Critères d'interprétation
Autres			
Linezolide	<i>Pas de résistance</i>	<i>Pas de résistance</i>	EUCAST 2024
Rifampicine	<i>Pas de résistance</i>	1 (2)	CA-SFM, 2013
Sulfonamide *	8 (44)	13 (23)	CA-SFM, 2013
Triméthoprim	11 (61)	11 (19)	CA-SFM, 2013
Cotrimoxazole	12 (67)	13 (23)	EUCAST 2024
Vancomycine	<i>Pas de résistance</i>	<i>Pas de résistance</i>	CA-SFM, 2013

Note : les isolats en catégorie R (résistant) excluent les deux autres catégories (sensibles et sensibles à forte posologie). Les données sont basées sur les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode des gradients en bandelettes E-test, sauf pour les antibiotiques annotés avec une étoile (*), pour lesquels les données sont basées sur les diamètres, car aucune bandelette à gradient n'est disponible.

Dans l'ensemble, les isolats de *C. diphtheriae* restent sensibles aux antibiotiques de première intention (amoxicilline, macrolides) à quelques exceptions près. En effet, en ce qui concerne l'amoxicilline, seul 3 isolats tox- sont résistants. Deux de ces isolats ont été isolés chez des individus ayant séjourné au Sri Lanka ou au Congo, tandis que le troisième provient de la région parisienne, sans indication de voyage récent. Pour la pénicilline, 1 tox+ et 7 tox- sont résistants. L'isolat tox+ a été isolé chez un individu originaire de la Côte d'Ivoire. Sur les 7 isolats tox-, on retrouve les 3 isolats résistants à l'amoxicilline ainsi que 3 isolés d'individus ayant séjourné dans différents pays d'Afrique et 1 isolé d'Avignon sans voyage récent.

Pour l'érythromycine, 1 isolat tox+ est résistant, provenant de l'individu originaire de la Côte d'Ivoire, également résistant à la pénicilline. 3 isolats tox-négatifs sont résistants, un a été isolé en Guyane, le second d'un patient ayant séjourné au Sénégal et le troisième avec voyage au Sri Lanka, correspondant à un des isolats résistants à l'amoxicilline.

Isolats multirésistants. Ils sont définis comme résistants à 3 classes d'agents ou plus, hors résistance naturelle à la fosfomycine, sur la base des antibiotiques suivants : pénicilline, amoxicilline, oxacilline, tétracycline, gentamycine, azithromycine, clarithromycine, érythromycine, clindamycine, spiramycine, ciprofloxacine, moxifloxacine, rifampicine, sulfaméthoxazole, triméthoprim et cotrimoxazole.

Parmi les 75 isolats humains tox+ et tox-, 31 multi-résistants sont observés en 2024. Tous sont des *C. diphtheriae*, et 42% des isolats multirésistants sont associés à un voyage à l'étranger.

Le tableau ci-dessous montre le profil de résistance des cinq isolats *C. diphtheriae* résistants à au moins 8 agents antimicrobiens : 4 isolats tox- et 1 tox+.

Tableau : *C. diphtheriae* multirésistants aux agents antibactériens

Isolats	Gène <i>tox</i>	Pénicilline	Amoxicilline	Oxacilline	Céfotaxime	Erythromycine	Azithromycine	Clarithromycine	Spiramycine	Gentamicine	Sulfonamide	Triméthoprine	Cotrimoxazole	Tétracycline	Ciprofloxacine	Moxifloxacine	Méropénème	Nombre d'antibiotiques
FRC2160	-	R		R						R	R	R	R		R	R		8
FRC2142	-	R		R						R	R	R	R	R			R	9
FRC2268	-	R		R		R	R		R	R	R	R	R					9
FRC2381	-	R	R	R	R	R	R	R		R							R	9
FRC2250	+	R		R		R	R		R	R	R	R	R	R	R	R		12

L'isolat résistant à 12 antibiotiques est un *tox*+ obtenu à partir d'un prélèvement cutané réalisé chez un patient originaire de Côte d'Ivoire. Les trois isolats résistants à 9 antibiotiques sont des *tox*-, obtenus à partir des prélèvements cutanés réalisés chez trois patients. Un des patients avait séjourné au Soudan, le deuxième patient avait séjourné au Sénégal et le troisième au Sri Lanka. L'isolat résistant à 8 antibiotiques est aussi un *tox*- obtenu à partir d'un prélèvement cutané chez un patient originaire d'Avignon.

En conclusion, ces données montrent, de manière similaire aux années précédentes, une émergence de souches multirésistantes de *C. diphtheriae*, liée dans leur majorité à des cas importés. La pénicilline est fréquemment touchée, majoritairement chez les souches *tox*-, parfois en combinaison avec une résistance aux macrolides. La résistance conjointe à ces deux antibiotiques de première intention (recommandés par l'OMS ; en France, l'amoxicilline est utilisée plutôt que la pénicilline) reste exceptionnelle mais est à surveiller tout particulièrement.

3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

National. Il n'y a pas de réseau national de surveillance de la diphtérie. La maladie étant à déclaration obligatoire, le CNR réalise la surveillance de la diphtérie en recevant les souches envoyées par les laboratoires, ou des échantillons cliniques, pour recherche du gène *tox*.

Le CNR informe Santé publique France en temps réel pour chaque détection d'un isolat porteur du gène *tox*.

Une déclaration obligatoire est renseignée par le laboratoire prescripteur. Des analyses épidémiologiques sont faites au cas par cas avec Santé publique France et les ARS et/ou CIRE.

Des analyses microbiologiques populationnelles des souches des localités d'Outre-Mer sont réalisées avec les collègues locaux.

International : Participation à un laboratoire Européen de Référence (EURL). Alors que jusqu'à l'an dernier, il n'existait pas de réseau professionnel sur le diagnostic et la surveillance de la diphtérie à l'international, 2024 a vu la **création du laboratoire Européen de Référence en santé publique pour la coqueluche et la diphtérie (EURL-PH-DIPE)**, dont le CNR français fait partie conjointement à 3 autres laboratoires de référence en Belgique, Allemagne et Finlande. Ce consortium de laboratoires Européens est coordonné par Prof Qiushui He (Université de Turku,

Finlande). L'annonce officielle de création de ce laboratoire est disponible ici : https://health.ec.europa.eu/health-security-and-infectious-diseases/surveillance-and-early-warning/eu-reference-laboratories-public-health_en.

Le mandat du consortium est de 7 ans et consistera à animer en concertation avec l'ECDC, un réseau de laboratoires nationaux de référence à l'échelle européenne, avec comme activités principales : CEQs, renforcement de capacité, conseil, séroprévalence, épidémiologie génomique. La participation du CNR français témoigne de sa reconnaissance internationale construite durant les années précédentes.

Depuis 2017, le CNR avait initié plusieurs collaborations internationales avec notamment le laboratoire du « Department of Microbiology, National Reference Centre for Toxigenic Corynebacteria, Universitair Ziekenhuis Brussel, Vrije Universiteit Brussel », Bruxelles (Belgique) ; et le laboratoire « German Consiliary Laboratory on Diphtheria », Oberschleisheim, Allemagne, inclus dans le consortium EURL-PH-DIPE.

Des contacts existent également avec le Centre Collaborateur OMS de la diphtérie (Androulla Efstratiou, UKSHA) et le nouveau centre Collaborateur OMS en Allemagne (Andreas Sing, Munich). Nous échangeons avec ces centres sur les méthodes diagnostiques, les besoins de formation internationaux et le typage génomique des souches.

En 2024, nous avons publié les résultats de la collaboration lancée à notre initiative en 2021 avec le laboratoire de développement de l'EUCAST (Gunnar Kahlmeter et collègues) et le laboratoire de référence allemand pour la diphtérie en Bavière (Andreas Sing et collègues). Cette collaboration a abouti à définir une méthodologie et des données sur lesquelles définir les seuils critiques de l'EUCAST (en vigueur en version 13 et ultérieures). Voir le point 6.1 pour la publication.

Nous avons également continué la collaboration avec SpF, l'ECDC et une dizaine de laboratoires Européens dans le cadre de l'épidémie chez des migrants, de formes principalement cutanées à *C. diphtheriae* *tox+*. L'étude a été renforcée en 2024 par une analyse détaillée des informations cliniques disponibles, l'analyse génomique des isolats de 2023. Une version révisée de la publication a été soumise en octobre 2024 (voir le point 6.1).

Enfin, les membres du CNR assurent le rôle de curateur de la base de données des génotypes MLST et cgMLST de *C. diphtheriae* (<https://bigsdbs.pasteur.fr>), standard international qui permet la comparaison des souches et le recensement de la biodiversité du complexe *diphtheriae*. A ce titre, nous sommes en contact avec nos collègues à l'international et collaborons sur le génotypage des souches épidémiques. En 2024, nous avons étendu ce système de génotypage aux souches de *C. ulcerans* (voir point 6.1).

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

En 2024, le CNR a finalisé ou publié, plusieurs études ponctuelles concourant à la surveillance de la diphtérie (voir publications). En particulier :

- Une étude rétrospective des cas d'infections à *C. diphtheriae* et *C. ulcerans* en Guyane française (Gaillet et al., Emerg Inf Dis, 2024)

- Une étude d'un cas de polyneuropathie diphtérique à Mayotte
- Une étude observationnelle rétrospective sur les formes cutanées en France métropolitaine.

Ces études sont détaillées dans le paragraphe 6.1

4. Alertes

Lorsque le CNR détecte la présence du gène *tox*, il alerte directement Santé publique France par courriel (alerte@santepubliquefrance.fr et dmi-diphtherie@santepubliquefrance.fr), en même temps que le rendu du résultat *tox* au laboratoire expéditeur. Les alertes sont réalisées selon les recommandations du HCSP (http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspr20110304_conduitediphtherie.pdf). Nous envoyons systématiquement, en parallèle au courriel contenant les résultats, un courriel de suivi aux biologistes, contenant les informations nécessaires pour gérer les cas lors de la détection du gène *tox* dans un isolat.

4.1. Cas groupés ou phénomènes anormaux

- Nous avons alerté en mars et en juillet 2024 sur sept cas au total, possiblement liés à l'évènement de diphtérie cutanée chez des migrants, majoritairement d'Afghanistan et de Syrie, signalé en 2022. Deux génotypes (groupes génétiques) observés dans cet évènement ont été retrouvés en France en 2024, certains isolats étant résistants aux macrolides.

4.2. Nombre d'alertes

En 2024, 89 alertes ont été réalisées, dont 40 correspondent à des souches isolées chez l'homme (19 *C. diphtheriae* et 21 *C. ulcerans*) et 49 souches à des souches isolées chez l'animal (9 *C. diphtheriae* et 40 *C. ulcerans*).

4.3. Sollicitations et aide à la décision

- Le CNR a été consulté par SpF à l'occasion de la révision de la fiche de Déclaration obligatoire (mai 2024)

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé

Le site web du CNR donne nos informations de contact : courrier électronique et téléphone. Nous recevons 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 pour les analyses ou diphtherie-conseil@pasteur.fr pour les conseils). 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.

Le CNR envoie systématiquement, en même temps que le courriel contenant les résultats, un courriel aux biologistes contenant les informations nécessaires pour gérer les cas lors de la détection du gène *tox* dans un isolat.

Une Foire Aux Questions (<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/centres-nationaux-reference/cnr/corynebacteries-du-complexe-diphtheriae/foire-aux-questions>) est en ligne sur le site web du CNR, qui répond aux questions les plus fréquentes :

- Quelles sont les situations pour lesquelles la recherche du gène *tox* doit être faite en urgence ?
- Quelles sont les recommandations pour l'utilisation des antitoxines diphtériques ?
- Conduite à tenir dans les cas particuliers 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 à *Corynebacterium diphtheriae* ou *ulcerans tox*-négatif
- Le CNR couvre-t-il les Corynébactéries en général, dont *C. striatum* ou *C. pseudodiphtheriticum* ?

En 2024, nous avons documenté une trentaine d'appels de la part de médecins biologistes ou infectiologues qui souhaitaient des renseignements divers sur la diphtérie, la prise en charge d'un cas ou autour d'un cas, et/ou sur l'envoi des échantillons au CNR. Ces appels sont tracés sur un support d'enregistrement dédié.

En 2024, nous avons aussi continué à apporter une aide au diagnostic à plusieurs laboratoires (voir section Transfert de techniques).

5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- Nous sommes en contact quasi-quotidien avec SpF dans le cadre de nos alertes en cas de détection du gène *tox*. En 2024, 89 alertes (notifications de détection de souches *tox+*) 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.
- Voir section 4.3 pour les conseils aux autorités sanitaires françaises réalisées.
- Dans le cadre de la réponse au cyclone Chido à Mayotte, le CNR a répondu aux sollicitations de SpF en ce qui concerne le risque de diphtérie et son intégration dans la documentation pour les équipes de réponse (CESPA, etc).

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

- Pas de communication presse ou grand public sur la diphtérie en 2024
- Julie Toubiana : Rédaction du chapitre Diphtérie du livre national d'infectiologie ePilly. Parution prévue début 2025.

5.4. Activité de formation

Notre unité BEBP fait partie du consortium « **Formation interdisciplinaire en épidémiologie génomique et en bioinformatique de la santé publique (GenEpi-BioTrain)** » (<https://www.pasteur.fr/fr/enseignement/programmes-cours/formation-interdisciplinaire-epidemiologie-genomique-bioinformatique-sante-publique>), financé par l'ECDC. GenEpi-BioTrain est un programme de formation interdisciplinaire visant à renforcer la surveillance, la préparation et la capacité de réponse aux épidémies en s'appuyant sur des approches de bioinformatique en santé publique et d'épidémiologie génomique. Il s'adresse à des professionnels issus de domaines variés (microbiologie, bioinformatique, épidémiologie, génomique, etc.), sans qu'une expérience préalable en bioinformatique ne soit requise.

Dans le cadre de ce programme, le responsable du CNR, Sylvain Brisse, co-PI de ce projet, a également organisé des visites d'échange d'une semaine (en octobre 2024) pour encourager le partage de compétences et créer un réseau de soutien pour la surveillance de la diphtérie. En outre, un atelier de deux semaines en présentiel (30 participants, 10 pays Européens, en décembre 2024) sur les maladies à prévention vaccinale (dont la diphtérie) a été mis en place, avec la participation de plusieurs intervenants du CNR ou de l'unité BEBP afin de présenter la surveillance de la diphtérie en France, la structure des populations de *C. diphtheriae*, et l'analyse des données microbiologiques et génomiques. Les interventions correspondantes principales du CNR sont listées dans la partie 6.2, séminaires et conférences.

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1. Épidémie Européenne à *C. diphtheriae* toxigène

Déjà mentionné dans le rapport de l'année précédente, une mise à jour est donnée ici :

L'analyse de l'épidémie Européenne touchant des migrants, étude déjà mentionnée dans les rapports 2023 et 2024, a été poursuivie. Les données cliniques ont été analysées à partir des données disponibles dans les différents pays, montrant la diversité des tableaux cliniques des cas de diphtérie et de leur prise en charge. Par ailleurs, les séquences génomiques des isolats de 2023 ont été ajoutés à l'analyse de celles de 2022, ce qui montre une certaine transmission des souches de 2022 jusqu'en 2023, sur la base de leur similarité génomique (mêmes groupes génétiques) ; ceux-ci sont de plus également observés en France en 2024, voir section 4.1.

Cette étude collaborative internationale, en partie coordonnée par le CNR (S. Brisse est l'auteur correspondant), a été soumise pour publication (seconde révision) et est postée sur medRxiv (Hoefler et al., Octobre 2023 :

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2023.11.10.23297228v1>).

6.1.2. Développement d'un système de génotypage génomique pour *C. ulcerans*

Déjà mentionné dans le rapport de l'année précédente, une mise à jour est donnée ici :

Un projet visant à développer une méthode de génotypage cgMLST pour *C. ulcerans*, agent zoonotique de la diphtérie, a été poursuivie et un manuscrit a été soumis pour publication en 2024.

Le schéma cgMLST combine 1 628 loci et présente une résolution élevée pour le sous-typage des souches. Nous démontrons son utilité pour saisir la structure de la population en définissant des sous-lignées (SL, maximum 940 différences alléliques) et des groupes clonaux (CIG, pour clonal group ; 194 différences alléliques, AD). La présence ou de l'absence du gène de la toxine varie fortement d'un groupe clonal à l'autre. Pour la surveillance épidémiologique, nous définissons des groupes génétiques (genetic cluster, CG ; 25 différences alléliques maximum), correspondant à des chaînes de transmission potentielle non détectées sur la base des données épidémiologiques. Certains groupes génétiques correspondent à des groupes de cas associés à des régions géographiques spécifiques en France. Le schéma cgMLST est accessible au public via la plateforme BIGSdb-Pasteur (<https://bigsdb.pasteur.fr/diphtheria>) et fournit un cadre commun pour étudier l'écologie, l'évolution et le suivi de la transmission et de la propagation de *C. ulcerans* entre les hôtes et aux échelles spatiales locales et mondiales.

Cette étude a été postée sur le serveur de préprints bioRxiv en août 2024 : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.22.609154v1> .

Cette nouvelle méthode a été utilisée pour l'analyse génomique des *C. ulcerans* (section 3.2).

6.1.3. Série de cas d'infections de *C. ramonii* dans la ville de Vancouver

Une nouvelle espèce, *C. ramonii*, avait été décrite en 2023 par le CNR et l'unité qui l'héberge ; il s'agit d'une espèce proche de *C. ulcerans*. Nous avons été contactés par l'Université de Colombie Britannique et l'hôpital Saint Paul, à Vancouver, Canada, ayant fait face entre 2019 et 2023 à des infections à *C. ramonii* dans des populations défavorisées vivant en centre-ville. Une étude conjointe des caractéristiques cliniques, épidémiologiques et microbiologiques a été réalisée, montrant une présentation clinique similaire aux infections à *C. diphtheriae* cutanées, et suggérant une transmission interhumaine sur la base de l'absence d'exposition animale et de similitude génétique entre les isolats cliniques.

L'étude a été postée sur bioRxiv en septembre 2024 : <https://doi.org/10.1101/2024.09.26.24314455> (et publiée dans Emerging Infectious Diseases en février 2025).

6.1.4. Précision du séquençage Nanopore et surveillance épidémiologique

Le séquençage 'long-reads' Nanopore apporte des bénéfices importants en surveillance épidémiologique et recherche sur les pathogènes bactériens, permettant un séquençage rapide et la définition précise des éléments génétiques mobiles (dont le prophage portant le gene *tox*). Alors que cette technologie souffrait de manque de précision jusqu'à récemment, la chimie des réactifs version R10.4.1 promettait d'apporter une précision nettement supérieure. Le CNR a cherché à évaluer cette précision sur des souches de *C. diphtheriae* en utilisant différentes versions d'outils d'analyses bio-informatiques des données. Notre étude a montré que les assemblages génomiques obtenus en utilisant le 'basecaller' Dorado en option SUP (super-précise) et en assemblant les données avec l'outil Flye, sont de précision comparable à celle de la technologie de référence (Illumina) et donc compatibles avec une utilisation en surveillance ou analyse d'épidémies. Les mêmes résultats ont été démontrés pour deux autres agents pathogènes bactériens, *Bordetella pertussis* et *Klebsiella pneumoniae*.

L'étude a été postée sur bioRxiv le 3 octobre 2024 : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.10.03.616467v1> et soumise pour publication.

6.1.5. Développement d'anticorps pour un test de diagnostic rapide pour la diphtérie

Aucun test de détection rapide de la diphtérie n'existe actuellement, à l'échelle internationale. Ce manque est d'autant plus critique que la plupart des cas de diphtérie ont lieu dans des contextes éloignés des laboratoires de référence équipés de tests d'Elek et de qPCR, rendant la confirmation biologique des cas impossible. Le CNR et l'unité l'hébergeant ont initié un projet de détection de la toxine diphtérique par anticorps, par exemple dans un format de bandelettes d'immunochromatographie, qui pourrait répondre à ce besoin (diagnostic à partir d'échantillons cliniques, si suffisamment sensible), et a minima remplacer le test d'Elek, fastidieux et lent.

L'approche que nous poursuivons consiste à développer des anticorps de camélidés (nanobodies, ou VHH), faciles à manipuler biochimiquement et moléculairement du fait de leur petite taille et chaîne unique. Ce projet avait été démarré en collaboration avec la plateforme d'Ingénierie des Anticorps de l'Institut Pasteur, mais a été interrompu par l'épidémie

de COVID19, et est maintenant à nouveau actif.

Un vaccin contenant l'anatoxine diphtérique a été utilisé pour l'immunisation de deux alpagas. Après immunisation, les lymphocytes du sang périphérique (PBMC) ont été purifiés. Les ARN des PBMC ont été extraits, puis rétrotranscrits en ADNc. L'ADNc des VHH a été amplifié par PCR avec des amorces spécifiques, les amplicons clonés pour constituer une bibliothèque de phage. À partir de cette bibliothèque, les phages sont sélectionnés en les incubant avec la toxine diphtérique puis extraits. Cette étape de sélection (*panning* en anglais) a été répétée trois fois pour enrichir la population en phages ayant la meilleure affinité pour l'antigène.

A ce stade, en 2024, nous avons analysé 600 clones positifs par criblage ELISA puis séquencés, permettant d'identifier huit VHH distincts. Ceux-ci sont fusionnés à un fragment Fc pour les rendre dimériques, puis produits en grande quantité et purifiés par chromatographie d'exclusion d'affinité et de taille. L'étape suivante sera de rechercher une paire de VHH-Fc se fixant à deux endroits différents de la toxine diphtérique, permettant de mettre en place des réactions (ELISA, bandelette ou autre format) en sandwich VHH-Fc-DT. Il s'agira ensuite de tester la détection de la toxine à partir de cultures de souches de *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans*, puis de manière plus ambitieuse, à partir d'échantillons cliniques.

6.1.6. Test de toxigénicité contre les cellules VERO

Si le test d'Elek utilisé au CNR actuellement permet la détection de la toxine diphtérique en tant que protéine produite et immunologiquement reconnue, il ne permet pas de connaître sa toxigénicité. La diversité naturelle de la toxine diphtérique nous interroge sur leur toxigénicité. Le CNR s'attache à mettre au point cette méthode afin de tester le pouvoir toxique des différentes formes de la toxine (y compris celles de *C. ulcerans* ou *C. pseudotuberculosis*). Cela permettra également de tester la capacité d'anticorps à protéger les cellules, dans un test fonctionnel d'inhibition de la toxine.

En 2024, nous avons mis en place la culture des cellules VERO, et avons également dosé la toxicité de deux lots de toxine diphtérique commerciale sur ces cellules, montrant des résultats conformes aux attentes.

La suite du projet consistera à mettre au point et tester la toxicité des toxines issues d'isolats cliniques, et également de mettre au point la protection des cellules VERO par des anticorps (commerciaux ou nanobodies produits dans notre projet décrit ci-dessus). Pour le premier point, le défi est de trouver et de contrôler les conditions optimales d'expression de la toxine diphtérique par les isolats cliniques. La suite de ce projet dépendra de la disponibilité technique de l'équipe, ou de stagiaires.

6.2. **Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR**

(i) **Publications nationales**

1. **La diphtérie zoonotique à *Corynebacterium ulcerans* à l'interface des santés humaine et animale.** Laaberki MH, Djelouadji Z, Ayral F, Bouchard M, Brisse S. *Le Point Vétérinaire*.vol 454, June 2024
<https://www.lepointveterinaire.fr/publications/le-point-veterinaire/article/n-454/la-diphtherie-zoonotique-a-corynebacterium-ulcerans-a-l-interface-des-santas-humaine-et-animale.html>
2. **Infections à *Corynébactéries diphtheriae* (diphtérie).** Makinson, Montpellier et J. Toubiana, **sous presse**, prévu en 2025

(ii) **Publications internationales**

1. ***Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*: development of EUCAST methods and generation of data on which to determine breakpoints.** Berger A, Badell E, Åhman J, Matuschek E, Zidane N, Kahlmeter G, Sing A, Brisse S. *J Antimicrob Chemother.* 2024 May 2;79(5):968-976. doi: 10.1093/jac/dkae056. PMID: 38497937
2. **Retrospective Study of Infections with *Corynebacterium diphtheriae* Species Complex, French Guiana, 2016-2021.** Gaillet M, Hennart M, Rose VS, Badell E, Michaud C, Blaizot R, Demar M, Carvalho L, Carod JF, Andrieu A, Djossou F, Toubiana J, Epelboin L, Brisse S. *Emerg Infect Dis.* 2024 Aug;30(8):1545-1554. doi: 10.3201/eid3008.231671. PMID: 39043387
3. **Cutaneous diphtheria from 2018 to 2022: an observational, retrospective study of epidemiological, microbiological, clinical, and therapeutic characteristics in metropolitan France.** Chêne L, Morand JJ, Badell E, Toubiana J, Janvier F, Marthinet H, Suppini JP, Valois A, Texier G, Brisse S, Dutasta F OEDIPE Study Group. *Emerg Microbes Infect.* 2024 Dec;13(1):2408324. doi: 10.1080/22221751.2024.2408324. PMID: 39324172.
4. **Intravenous Immunoglobulin in Diphtheritic Polyneuropathy.** Van Goethem T, Kerambrun H, Boue Y, Chamouine A, Brisse S, Toubiana J, Franco J. *Pediatr Infect Dis J.* 2024 Aug 1;43(8):e294-e295. doi: 10.1097/INF.0000000000004367. PMID: 38621171.

(iii) **Préprints:**

1. Detection of diphtheria toxin-producing *Corynebacterium ramonii* in wounds of an urban, inner-city population in Vancouver, Canada, 2019-2023

Christopher F. Lowe, Gordon Ritchie, Chiara Crestani, Miguel Imperial, Nancy Matic, Michael Payne, Aleksandra Stefanovic, Diana Whellams, Sylvain Brisse, Marc G. Romney

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2024.09.26.24314455v1> posté le 27 septembre 2024

2. Genomic Epidemiology and Microevolution of the Zoonotic Pathogen *Corynebacterium ulcerans*

Chiara Crestani, Virginie Passet, Martin Rethoret-Pasty, Alexis Criscuolo, Nora Zidane, Sylvie Brémont, Edgar Badell, Sylvain Brisse

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.22.609154v1> posté le 22 août 2024

3. Accurate genotyping of three major respiratory bacterial pathogens with ONT R10.4.1 long-read sequencing

Nora Zidane, Carla Rodrigues, Valérie Bouchez, Martin Rethoret-Pasty, Virginie Passet, Sylvain Brisse, Chiara Crestani

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.10.03.616467v1> posté le 3 octobre 2024

(iv) **Communications nationales**

- Une conférence a été donnée dans le cadre de la série de webinaires du REMIC's
- Une conférence a été donnée dans le cadre du colloque Mayotte en Santé

Voir détails dans le tableau ci-dessous.

(v) **Communications internationales**

- Cinq séminaires ont été donnés dans le cadre du programme de formation de l'ECDC, GenEpi-BioTrain : <https://www.pasteur.fr/en/education/programs-and-courses/interdisciplinary-training-genomic-epidemiology-and-public-health-bioinformatics>

(vi) **Conférences sur invitation**

- Une conférence invitée a été donnée dans le cadre du colloque scientifique annuel du Robert Koch Institute, Berlin, Allemagne
- Une conférence invitée a été donnée dans le cadre de l'évènement One Health Award, Teramo, Italie

Tableau : conférences sur la diphtérie données par Sylvain Brisse, 2024

Date	Évènement	Lieu	Titre	Statut
28 mars 2024	REMIC's webinaires	SFM, Section Microbiologie clinique	La diphtérie, une maladie oubliée qui réémerge	Orateur invité
23 mai 2024	Robert Koch Colloquium 2024	Robert Koch Institute, Berlin	Understanding the Reemergence of Vaccine-Preventable Bacterial Infections: Insights from Global Pathogen Genomics	Orateur invité
10 septembre 2024	Colloque Mayotte en Santé, 2024	Hybride/online (Mamoudzou, Mayotte)	La diphtérie à Mayotte et dans l'Océan Indien : aspects épidémiologiques et microbiologiques	Orateur invité
25 septembre 2024	Formation GenEpi-BioTrain (ECDC)	Institut Pasteur, Paris	Diphtheria surveillance in France	Organisateur & orateur
01 octobre 2024	Formation GenEpi-BioTrain (ECDC)	Institut Pasteur, Paris	<i>C. diphtheriae</i> population structure	Organisateur & orateur
02 octobre 2024	Formation GenEpi-BioTrain (ECDC)	Institut Pasteur, Paris	<i>C. diphtheriae</i> : antimicrobial resistance	Organisateur & orateur
11 octobre 2024	One Health Award, third edition	IZS Teramo, Italie	Diphtheria and Africa: an update in 2024	Orateur invité
5 décembre 2024	Formation GenEpi-BioTrain (ECDC)	Institut Pasteur, Paris	Diphtheria surveillance in France	Organisateur & orateur
5 décembre 2024	Formation GenEpi-BioTrain (ECDC)	Institut Pasteur, Paris	<i>C. diphtheriae</i> population structure	Organisateur & orateur

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

a. Coopération avec les laboratoires de santé animale

Il n'existe pas de LNR ou laboratoire de santé animale concernant la diphtérie. Le CNR est en contact très régulier avec les gros laboratoires d'analyses médicales vétérinaires (par exemple, CERBA-VET/ANTECH, VETODIAG). Nous échangeons régulièrement par téléphone, visioconférence ou mail avec ceux-ci autour de cas particuliers ou pour des bilans.

Nous avons réalisé et publié une revue sur la diphtérie animale avec des collègues des écoles vétérinaires (Laaberki et al., 2024 ; voir section publications).

b. Coopération avec les laboratoires de sécurité sanitaire des aliments ou environnementaux

Néant - Cette thématique est peu pertinente concernant la diphtérie, même si la littérature ancienne suggérait une transmission de *C. diphtheriae* via le lait cru.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

--- Section éliminée du rapport public pour raisons de confidentialité ---

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1. Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Les missions spécifiques du Centre National de Référence, telles que définies dans le cahier des charges de l'appel à candidatures (SPF – 20 janvier 2022) sont de contribuer à l'expertise, aux conseils, à la surveillance et aux alertes.

1.1.1. Expertise

- ❖ Développer la collection d'isolats existants ;
- ❖ Identifier et typer les isolats, en détectant le gène de la toxine diphtérique et en recherchant sa production
- ❖ Apporter un soutien aux laboratoires de biologie médicales hospitaliers ou privés (isolement, transport, analyse)
- ❖ Maintenir une expertise et des collaborations concernant les corynébactéries animales ;
- ❖ Poursuivre l'analyse de la résistance aux antibiotiques de tous les isolats reçus au CNR ;
- ❖ Assurer le maintien d'une compétence bactériologique concernant les bactéries du complexe *diphtheriae*

1.1.2. Conseil

- ❖ Apporter son expertise pour la mise en charge clinique des cas
- ❖ Apporter son expertise dans le domaine de la vaccination antidiphtérique

1.1.3. Contribution à la surveillance épidémiologique

- ❖ Suivre la circulation des corynébactéries, porteuses du gène *tox* ;
- ❖ Suivre la sensibilité aux antibiotiques ;
- ❖ Contribuer aux études épidémiologiques ;
- ❖ Contribuer aux réseaux de surveillance européens.

1.1.4. Alerte

- ❖ Signaler à l'agence nationales de santé publique, les détections du gène *tox* et les cas groupés liés à des souches *tox*-négatives, ainsi que toute autre situation inhabituelle (augmentation des cas, cas groupés, souches « mutantes »).

1.2. Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

--- Section éliminée du rapport public pour raisons de confidentialité ---

1.3. Locaux et équipements

--- Section éliminée du rapport public pour raisons de confidentialité ---

1.4. Collections de matériel biologique

Voir annexe 4

1.5. Démarche qualité du laboratoire

Voir section 1 du rapport principal (Démarche Qualité)

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

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

Les techniques utilisées plus spécifiquement sont :

- PCR multiplexée en temps réel : 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. Cette technique est accréditée à la norme ISO 15189 (voir partie 1, document principal).
- Test d'Elek : Nous vérifions l'expression de la toxine à l'aide du test d'Elek, qui est un test d'immuno-précipitation dans un milieu gélosé. Cette technique a été modifiée en 2024 et a été rendue plus sensible.
- Isolement des bactéries : Pour l'isolement des bactéries du complexe *diphtheriae* nous réalisons dans un premier temps la culture sur un milieu gélosé (TSA ou Columbia) sur lesquelles on dépose de disques de fosfomycine à 200 µg (les corynébactéries sont naturellement résistantes à la fosfomycine). Ensuite, dans un deuxième temps, les bactéries qu'ont poussé au tour des disques de fosfomycine sont cultivés sur un milieu sélectif pour les corynébactéries appartenant au complexe *diphtheriae*, le milieu de Tinsdale, fabriqué à la plateforme de préparation de milieux de l'Institut Pasteur.
- Identification bactérienne : Nous complétons l'identification par des techniques de microbiologie telles que : coloration de Gram, galerie API Coryne, et spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le biovar est déterminé à partir des galeries API.
- Sensibilité aux antibiotiques : La sensibilité aux antibiotiques est testée par la méthode de diffusion de disques d'antibiotiques en milieu gélosé supplémenté avec du sang de cheval. Lorsqu'une résistance (ou sensibilité intermédiaire) est détectée, nous déterminons les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par Etest. Les interprétations suivent les recommandations 2024 de CA-SFM / EUCAST, ou CA-SFM 2013 pour celles qui ne sont pas couvertes par CA-SFM / EUCAST 2024 (V.1.0).
- Analyse génomique : 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.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

- ***Pour les prélèvements de suivi (criblage autour d'un cas ou suivi du cas) :***

L'isolement des corynébactéries peut être réalisé en utilisant un milieu gélosé (TSA ou Columbia) et de disques de fosfomycine à 200 µg. Si des bactéries poussent autour des disques de fosfomycine, elles peuvent alors être analysées par coloration de Gram, galerie API Coryne, et spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette approche est décrite sur le site web du CNR : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/centres-nationaux-reference/cnr/corynebacteries-du-complexe-diphtheriae/realiser-prelevements-suivi>.

La sélection de colonies en utilisant le milieu de Tinsdale n'est pas recommandée aux laboratoires car il n'est pas commercialisé et sa préparation « maison » n'est pas conseillée car la durée de vie est très courte et les réactifs sont coûteux.

- ***Pour les autres techniques de caractérisation :***

Le CNR recommande l'envoi des isolats au CNR.

Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

Cette annexe figure dans un document PDF distinct

Annexe 4 : Recensement des collections de matériels biologiques (non destinées à être rendues publiques)

Cette annexe figure dans un document PDF distinct