



RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2024

CNR Vibrions et choléra

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	Unité des Bactéries pathogènes entériques, Institut Pasteur	Pr François-Xavier Weill

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans ce rapport, faite dans l'autorisation écrite du CNR Vibrions et choléra, 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 au rapport utilisé. Toute référence aux données de ce rapport se mentionne de la façon suivante : Centre National de Référence Vibrions et choléra, Rapport annuel d'activité 2024 p. xx-xx – Institut Pasteur, Paris, France. Les données issues des tableaux et figures présentées dans ces rapports ne doivent pas être publiées sans l'accord explicite du CNR.

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
 1. Missions et organisation du CNR	 6
Organigramme	6
Mission et Organisation	6
Démarche Qualité	6
 2. Activités d'expertise	 8
2.1 Evolution des techniques	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	8
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	8
2.4 Collections de matériel biologique	9
2.5 Activités d'expertises	9
2.6 Activités de séquençage	12
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	14
 3. Activités de surveillance	 15
3.1 Description du réseau de partenaires	15
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	19
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	25
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	28
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	29
 4. Alertes	 30
 5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	 32
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	32
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	33
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	34
 6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	 36
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	36
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	38

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	39
8. Programme d'activité pour les années suivantes	40
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	41
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	41
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	43
1.3 Locaux et équipements	43
1.4 Collections de matériel biologique	46
1.5 Démarche qualité du laboratoire	46
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	48
2.1 Liste des techniques de référence	48
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	50

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

Depuis 2022, le nombre de cas de choléra et le nombre de pays ayant déclaré des épidémies, n'a fait qu'empirer au niveau mondial. En décembre 2022, l'OMS a émis une alerte sur cette explosion sans précédent du choléra dans le monde, associée au taux de létalité le plus élevé enregistré depuis plus d'une décennie. Cette tendance s'est poursuivie en 2023 et 2024. L'année 2024 a été marquée par l'épidémie de choléra à Mayotte entre avril et juillet (221 cas probables ou confirmés) faisant suite à l'épidémie qui avait débuté aux Comores. Dans le cadre de l'épidémie de Mayotte, 126 souches isolées ont été transmises au CNR pour expertise et 8 diagnostics ont pu être confirmés par PCR directement sur les selles sans isolement de souche. En France métropolitaine, 5 souches de vibron cholérique issues de cas importés ont été confirmées par le CNRVC.

En 2024, le nombre d'infections à vibrions non cholériques (VNC) a atteint le chiffre le plus élevé rapporté pour ces infections depuis la mise en place de la surveillance en 1995, avec un total de 180 cas, majoritairement associés aux espèces *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus*. Le nombre de souches de *V. parahaemolyticus* analysées au CNR était supérieur à celui des souches de *V. cholerae*. Les infections à *V. parahaemolyticus* étaient toutes des gastro-entérites, majoritairement acquises en France métropolitaine (75%) sur la côte atlantique et en lien avec la consommation de produit de la mer (60%). Les cas d'infections à *V. cholerae* étaient majoritairement (61%) importés de pays où les normes en matière d'hygiène et d'assainissement font défaut et la majorité de ces cas (95%) étaient des gastro-entérites. Des infections sévères avec bactériémies ont également été rapportées pour cette espèce. Trois cas d'infection à *V. vulnificus*, toutes sévères dont une fatale, ont également été identifiés.

EXECUTIVE SUMMARY

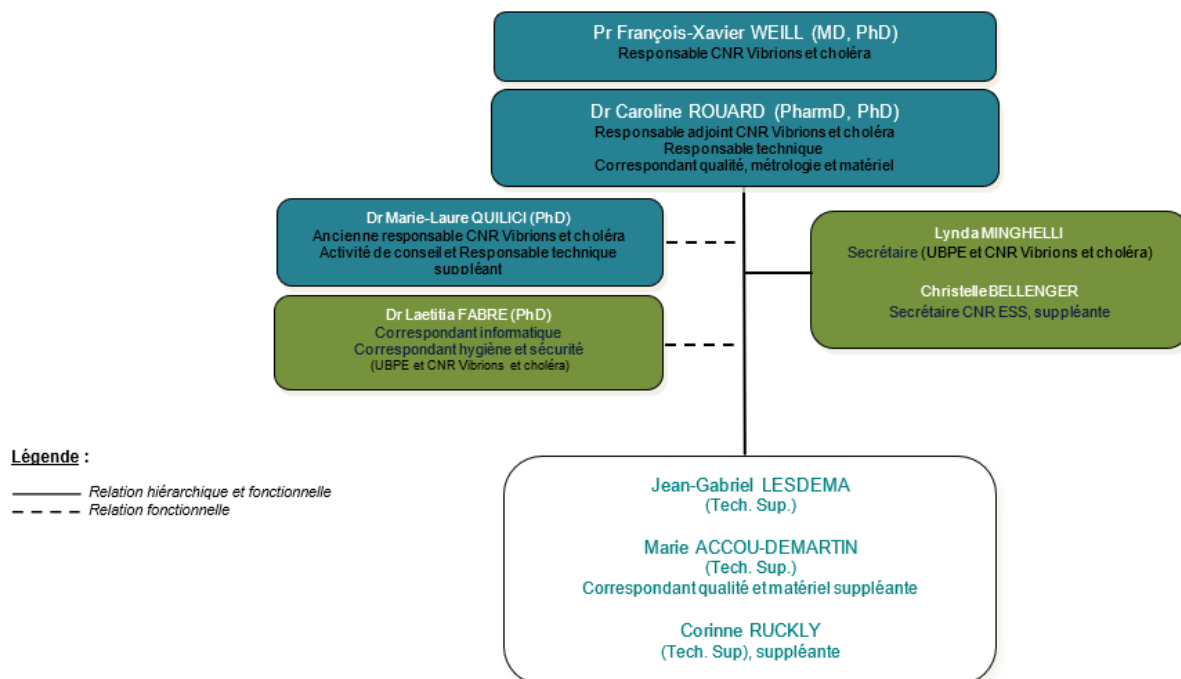
Highlights

Since 2022, the number of cholera cases and the number of countries reporting outbreaks have been on the rise worldwide. In December 2022, WHO issued an alert on this unprecedented explosion of cholera worldwide, associated with the highest case-fatality rate recorded in over a decade. This trend continued in 2023 and 2024. The year 2024 was marked by a cholera outbreak in Mayotte between April and July, (221 cases) following on from the epidemic that had begun in the Comoros. One-hundred-twenty-six isolates from the Mayotte outbreak were sent to the CNR for expertise and sequencing (8 additional cases were confirmed with molecular biology only directly on stool). In mainland France, 5 cases of cholera (all imported) were identified in 2024.

In 2024, the number of non-cholera vibrio (NCV) infections reached the highest figure reported for these infections since surveillance began in 1995, with a total of 180 cases, mostly associated with *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* species. The number of *V. parahaemolyticus* strains analysed at the CNR exceeded the number of *V. cholerae* strains. All *V. parahaemolyticus* infections were gastroenteritis, mostly acquired in mainland France (75%), on the Atlantic coast, in association with seafood consumption (60%). The majority (61%) of *V. cholerae* infections were imported from countries where hygiene and sanitation standards are lacking, and the majority of these infections (95%) were gastroenteritis. Severe infections with bacteremia were also reported for *V. cholerae* infections. Three cases of severe *V. vulnificus* infections – all severe including one death – were identified.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme



UBPE : Unité des Bactéries pathogènes entériques
CNR ESS : CNR E. coli Salmonella Shigella

Mission et Organisation

Missions : voir Annexe 1

Organisation : pas de modification par rapport au dossier de candidature présenté en mai 2022.

Démarche Qualité

Le CNR Vibrions et choléra 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 30 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 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 ;
- 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.

L'ensemble des CNR/CIBU participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. 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 annuelle 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. Le CNR Vibrions et choléra participe à deux échanges inter-laboratoires (EIL) comme contrôle externe de la qualité. Ces 2 EILs sont réalisés d'une part avec le CNR belge des *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* et d'autre part avec le LNR *Vibrio* de Boulogne-sur-Mer (ANSES).

L'année qualité 2024 du CNRVC s'est organisée de la façon suivante :

Etapes clés LREMS	Périodes de réalisation
Revue qualité	8 mars 2024
Revue de direction LREMS	24 juin 2024
Audits internes qualité et technique	audit interne technique (06/09/2024) audit interne qualité (19/12/2024)
Audit de surveillance COFRAC	Pas d'évaluation en 2024
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	NA

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 :

Depuis 2024, 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 a été déployé tout au long de l'année 2024 et au début de l'année 2025 au sein des CNR.

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

2. Activités d'expertise

2.1 Evolution des techniques

- Depuis 2018, le CNRVC a mis en place de façon systématique le séquençage complet du génome (WGS, whole-genome sequencing) de la totalité des souches de *Vibrio* reçues, en parallèle des techniques de bactériologie classique et moléculaires, afin d'enrichir une base de données génomique des vibrions cholériques et des VNC. La présence des gènes cibles pour le diagnostic et la détection des facteurs majeurs de pathogénicité a été validée pour les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. vulnificus*. L'identification de certaines espèces moins fréquemment isolées est également confirmée par les résultats de WGS. Depuis 2023, le WGS est réalisé en temps réel et utilisé pour le rendu des résultats d'identification selon le contexte et/ou les espèces étudiées, pour la détermination du résistome des souches isolées, également pour des analyses phylogénétiques des souches responsables de cas de choléra.

- Depuis 2020, le CNRVC réalise l'identification des différentes espèces de *Vibrio sp.* à l'aide de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) Sirius Bruker Daltonics. La base de données de Bruker (comprenant peu de spectres pour les espèces de *Vibrio sp* pouvant être isolés en clinique) est utilisée pour l'identification ainsi qu'une base de données développée par le CNRVC comprenant les spectres de 137 *V. cholerae* O1, 271 *V. cholerae* non-O1/non-O139, 48 *V. parahaemolyticus*, 17 *V. alginolyticus*, 10 *V. fluvialis*, 18 *V. vulnificus*, 4 *Grimontia hollisae* et 4 *V. furnisii*. Le MALDI-TOF est utilisé depuis 2023 pour l'identification de colonies isolées lors de la recherche de *Vibrio* à partir de selles de patients et en temps réel pour la confirmation d'identification des espèces.

- Le CNRVC a poursuivi l'évaluation de microplaques Sensititre™ à façon pour les *Vibrio* pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices en milieu liquide. Les résultats sont comparés aux méthodes standard de diffusion en milieu gélosé et aux données de génomique.

- Le CNRVC a poursuivi le développement de méthodes de PCR en temps réel (qPCR) pour la détection et la caractérisation des souches de vibrions cholériques (cibles d'identification d'espèce *V. cholerae*, *rffO1* et *ctxA* par sondes TaqMan). Depuis mi-2024, le CNRVC utilise une méthode de qPCR pour la recherche de l'espèce *V. cholerae*, du gène *rffO1* et du gène *ctxA* directement sur les prélèvements de selles.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Evaluation de différents milieux de culture sélectifs et non sélectifs pour la culture des *Vibrio*.

Ce travail débuté en 2023 est toujours en cours sur de nouvelles souches et prélèvements reçus.

Evaluation de différentes amorces et sondes pour la recherche du gène *ctxA* par PCR en temps réel.

Les amorces et sondes évaluées sont celles décrites dans Yan et al. Pathogens 2022, Robert-Pillot et al. Int J Food Microbiol 2014 (collaboration entre le CNR et le LNR de Boulogne-sur-Mer) et par le National Health Laboratory Service d'Afrique du Sud (Dr Anthony Smith). Cette évaluation a été effectuée sur des ADN extraits à partir de souches pures de différentes espèces de *Vibrio*, des souches de *V. cholerae* porteuses ou non du gène de la toxine cholérique et des ADN extraits à partir de selles. Cette évaluation a montré la supériorité des sondes et amorces de Robert-Pillot et al. Le travail se poursuit en optimisant le mix de qPCR utilisé avant de réaliser une validation de la méthode.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Transfert de capacités techniques

- Avril 2024 : Aide à la mise en place du diagnostic du choléra dans un laboratoire de biologie médicale

privé de Mayotte :

- Transfert de modes opératoires pour la culture et l'identification des souches de *V. cholerae*,
- Transfert de photos de culture pour aide à l'identification des colonies,
- Transfert de modes opératoires de PCR temps réel pour la recherche du gène *ctxA* (transfert de séquences d'amorces et de sondes de la littérature).
- Décembre 2024 : Transfert de modes opératoires pour la culture et l'enrichissement des selles pour la recherche de *Vibrio sp* à l'hôpital Saint-Antoine (Assistance publique-Hôpitaux de Paris) pour la caractérisation des dons de selles.
- Le CNRVC a transféré en 2024 à 21 laboratoires du réseau du CNR un protocole de recherche des espèces de *Vibrio sp.* à partir de prélèvements de selles à l'aide de milieux de culture couramment utilisés dans les laboratoires de biologie médicale.

2.4 Collections de matériel biologique

=> Cf Annexe 4 pour 2024

Transfert de matériel biologique

- Mai 2024 : Envoi de souches (*V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae* O1 *ctxA* négative, *V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Aeromonas sp*) et d'ADN (*V. cholerae* O1 *ctxA* positive) de *Vibrio sp* à un laboratoire de biologie médicale privé de Mayotte pour mise au point du diagnostic des vibrios dans le cadre de l'épidémie du choléra

2.5 Activités d'expertises

Parmi les échantillons reçus pour expertise au CNRVC en 2024, le nombre de souches ou de prélèvements cliniques provenant de France réceptionnés au CNRVC pour expertise est présenté dans le **Tableau 1**, le nombre de prélèvements d'origine non-humaine provenant de France est présenté dans le **Tableau 2**.

Tableau 1 : Nombre de souches ou prélèvements cliniques provenant de France réceptionnés au CNRVC et leur provenance

Origine géographique de l'expéditeur	Provenance (nombre de LBM/CH correspondants différents)	Prélèvements	Souches isolées	Total
Métropole	LBM (34)	21	125	146
	CHU/CH (32)	31	15	46
Mayotte	CH (1)	28	145	173
Outre-mer hors Mayotte	LBM (1)	2	0	2
	CHU/CH (3)	3	1	4
Total		85 [§]	286 [#]	371

LBM : laboratoires de biologie médicale ; CHU : centres hospitaliers universitaires ; CH : centres hospitaliers

[#] dont 5 souches n'appartenaient pas au genre *Vibrio*, 3 doublons, et 1 souche non résolue en culture.

[§] dont 45 prélèvements négatifs en culture, 3 souches n'appartenaient pas au genre *Vibrio*, 7 doublons et 4 prélèvements non remis en culture (uniquement pour biologie moléculaire).

Tableau 2 : Nombre de prélèvements d'origine non-humaine provenant de France réceptionnés au CNRVC

Origine	ADN	Souches isolées
Animal	0	2
Environnement (eau)	6	0

Le délai moyen de restitution de résultats du CNRVC aux laboratoires, incluant l'identification de l'espèce et la mise en évidence de gènes de pathogénicité, était en moyenne de 3,7 jours ouvrés à partir de la date de réception d'une souche (à l'exception des souches de Mayotte). Cette moyenne est conforme à l'objectif des 6 jours annoncés par le CNRVC sur son site internet. Les résultats pour les souches de *V. cholerae* O1 envoyées de Mayotte au cours de l'épidémie ont été rendus en moyenne en 8,4 jours. Ce délai est expliqué par l'utilisation systématique du WGS pour le rendu des résultats (l'étude génomique de ces souches était importante d'un point de vue épidémiologique, mais l'identification du vibron cholérique avait déjà effectuée au centre hospitalier de Mayotte). En dehors de Mayotte, treize souches ont été rendues hors délais (>6 jours), en lien avec une utilisation du WGS pour le rendu des résultats pour 7 d'entre elles. Suite à l'analyse de ces données, les délais de restitution des résultats ont été modifiés sur le site internet à 6 jours ouvrés pour l'espèce *V. cholerae* (1^{er} rendu des résultats éventuellement complété par le WGS) et 15 jours pour les autres espèces afin de prendre en compte les délais liés au WGS. L'analyse des prélèvements ne faisant pas partie des missions du CNRVC, il n'y a pas d'engagement sur les délais de rendu de résultats. Le délai moyen de rendu était de 3,9 jours ouvrés (hors prélèvements de Mayotte). Pour les prélèvements de Mayotte, le délai était de 9,6 jours ouvrés.

Les caractérisations, réalisées sur les souches isolées et les prélèvements de cas cliniques français, sont présentées dans le **Tableau 3** et le **Tableau 4** respectivement. Les méthodes appliquées à l'étude des souches et prélèvements sont détaillées en *Annexe 2* de ce document.

Tableau 3. Nombre et caractérisation des souches cliniques (dédoublonnées) issues des cas français par le CNRVC en 2024

Espèce (nombre de souches)	Culture	Identification MALDI-TOF	Identification moléculaire PCR	Séro-agglutination	PCR <i>ctxA</i>	WGS	Caractérisation WGS : identification d'espèce, recherche de facteurs de pathogénicité, typage, résistome	ATB Diffusion & Sensititre
<i>V. parahaemolyticus</i> (95)	95	95	95	-	-	95	Identification : <i>r72H</i> ; Pathogénicité : <i>tdh</i> , <i>trh</i> , T3SS1, T3SS2 Typage : <i>orf8</i> ; <i>toxRS</i> , MLST ; résistome	95
<i>V. cholerae</i> (181) 131 VcO1 <i>ctxA</i> (128+5) 50 VcNN + VcO1NT <i>V. mimicus</i> (1)	182	182	55 *	181	73 *	182	Identification : ISR; Pathogénicité: <i>st/sm</i> , <i>chxA</i> , <i>ctxA</i> , <i>ctxB</i> , <i>rstR</i> , <i>tcpA</i> , <i>hlyA</i> Typage : <i>rfbO1</i> , <i>rfbO139</i> , <i>wbeT</i> : recherche mutation Inaba, MLST, sérogroupage ; résistome	122 *
<i>V. alginolyticus</i> (11) <i>V. diabolicus</i> (7)	18	18	18	-	-	18	Identification : collagénase, différenciation <i>alginolyticus</i> et <i>diabolicus</i> à l'aide de Kraken; résistome	18
<i>V. fluvialis</i> (5) <i>V. furnissii</i> (3)	8	8	-	-	-	8	Identification : l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i> , sur le rMLST et sur l'analyse Kraken ; résistome	8
<i>V. vulnificus</i> (3)	3	3	3	-	-	3	Identification : <i>hly</i> ; résistome	3
<i>V. metschnikovii</i> (1) <i>V. harveyi</i> (1)	2	2	-	-	-	2	Identification : l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i> , sur le rMLST et sur l'analyse Kraken ; résistome	2

*Toutes les souches de choléra de Mayotte n'ont pas été testées pour les PCR *V. cholerae*, *ctxA* et la réalisation des antibiogrammes phénotypiques

VcO1 : *V. cholerae* O1; VcNN : *V. cholerae* non-O1/non-O139; VcO1NT : *V. cholerae* O1 non toxigène ; Kraken : outil de classification taxonomique basé sur les k-mers

➤ Les différentes techniques de caractérisation sont détaillées dans l'Annexe 2 :

- Culture sur milieu non sélectif (GNA, Gélose Nutritive Alcaline) et sélectif (TCBS, Thiosulfate Citrate Bile Saccharose)
- Identification MALDI-TOF : identification par spectrométrie de masse sur appareil Sirius Bruker Daltonics, utilisation de la base de données Bruker et base de données CNRVC
- Identification moléculaire PCR : PCR recherchant des gènes spécifiques d'espèces (ISR pour *V. cholerae*, *r72H* pour *V. parahaemolyticus*, collagénase pour *V. alginolyticus*, *hly* pour *V. vulnificus*)
- Séro-agglutination : détermination du sérotype (O1 ou O139) pour toutes les souches de *V. cholerae* isolées, du sérotype (Inaba, Ogawa) pour les *V. cholerae* O1
- PCR *ctxA* : recherche par PCR du gène *ctxA* codant pour la toxine cholérique pour les souches des espèces *V. cholerae*

Tableau 4. Niveau de caractérisation réalisé sur les prélèvements cliniques reçus au CNRVC en 2024

Prélèvement (nombre)	Culture directe sur milieu sélectif et non sélectif	Enrichissement en eau peptonée alcaline puis culture	PCR ou qPCR <i>V. cholerae</i> , <i>rfbO1</i> , <i>ctxA</i>	PCR <i>V. parahaemolyticus</i>	PCR <i>V. vulnificus</i>	PCR <i>V. alginolyticus</i>	Souche isolée (PCR*) (caractérisation cf Tableau 4)
Selles (84)	75	75	63	29	13	21	31 <i>Vibrio</i> + 3 <i>Aeromonas</i> (18*)

* PCR positive pour *V. parahaemolyticus* sans souche isolée pour 1 prélèvement, PCR positive pour *V. cholerae* sans souche isolée pour 17 prélèvements

2.6 Activités de séquençage

Le CNRVC a réalisé du séquençage WGS au cours de l'année 2024. Un séquençage WGS a été effectué sur 310 souches de *Vibrio* spp. cliniques et animales françaises expertisées par le CNRVC : 277 souches cliniques reçues au CNRVC et confirmées comme appartenant au genre *Vibrio*, 31 souches isolées au CNRVC à partir des prélèvements cliniques reçus et deux souches isolées d'animaux.

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
✕ OUI	Plateforme P2M de l'Institut Pasteur.
	Séquenceurs NextSeq 500 Illumina (utilisation du kit Nextera XT pour la préparation des librairies).

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
✕ OUI	Expertise interne au CNRVC et externe (plateforme P2M et hub de bioinformatique de l'Institut Pasteur).
	Trimming des reads et assemblage de novo réalisé par P2M avec le programme fq2dna (A. Criuscolo). Analyse des FASTA, recherche de gènes de résistance (Blast), recherche de gènes de virulence (Blast), Phylogénie réalisé en interne au CNRVC par outils open source (Abricate, AMRFinder, Blast, Snippy, Gubbins, RAxML) et scripts maison (pourcentage d'identité de gènes, détermination MLST, détermination séro groupe ...).

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
✕ OUI	Investigations intervenues dans le cadre de la surveillance pour les cas de choléra isolés sur le territoire français. Seule l'analyse génomique peut confirmer l'appartenance d'une souche à la lignée <i>V. cholerae</i> El Tor responsable de la 7ème pandémie (lignée nommée 7PET). Les souches de <i>V. cholerae</i> O1 toxigène isolées ont été incluses dans un arbre phylogénétique de plus de 1500 souches représentatives de la lignée 7PET. Cela a permis la confirmation de leur appartenance à la lignée 7PET ainsi que de confirmer ou déterminer la provenance géographique de la souche.

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)

- Analyse bio-informatique effectuée en complément d'analyses phénotypiques (caractères biochimiques et culturels, séro-agglutination, résistance aux antimicrobiens) et moléculaires (PCR spécifique d'espèce, gènes de toxine cholérique) pour les souches toxigènes de *V. cholerae* O1 (souches responsables du choléra)
 - o MLST (ST (Sequence Type) 69 et plus rarement ST515 pour *V. cholerae* O1 El Tor)
 - o Prédiction du sérotype (confirmation de l'agglutination O1 ou O139)
 - o Prédiction du sérotype (confirmation de l'agglutination Inaba ou Ogawa avec recherche de mutation du gène *wbeT*)
 - o Résistome (comparaison avec les résultats phénotypiques) : recherche de gènes de résistance acquis et mutations conférant une résistance aux quinolones et aux nitrofuranes ainsi que pour la réversion de la résistance aux polymyxines.
 - o Confirmation des facteurs de virulence et typage : recherche gène *ctxA*, typage *ctxB* par analyse de séquence
- Analyse phylogénétique : confirmation de l'appartenance à la lignée 7PET, confirmation ou détermination de la provenance géographique de la souche comme mentionné au point précédent. Importance des collaborations internationales du CNRVC afin de disposer de souches provenant de différents pays pour pouvoir construire un arbre phylogénétique robuste.
- Analyse bio-informatique effectuée en complément pour les vibrions non cholériques (VNC) comprenant notamment pour les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* :
 - o MLST (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*)
 - o Prédiction du sérotype (*V. cholerae*, base de données des séquences des différents sérogroupes)
 - o Prédiction du sérotype (*V. parahaemolyticus* : détermination de l'appartenance au groupe O3:K6)
 - o Résistome (comparaison avec les résultats phénotypiques)
 - o Recherche de gènes de virulence accessoires ou séquence de gènes : *hlyA*, *ctxA*, *stx* pour *V. cholerae* ; systèmes T3SS1 et T3SS2, gènes *tdh* et *trh* codant les hémolysines pour *V. parahaemolyticus*.

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

Epidémie de choléra à Mayotte entre avril et juillet 2024

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

310 souches de *Vibrio* spp. séquencées

Toutes les souches de *Vibrio* spp. reçues ou isolées à partir des prélèvements reçus ont été séquencées. Une sélection des souches de l'épidémie de choléra de Mayotte a été effectuée en amont de l'envoi au CNR en lien avec Santé publique France.

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

Dans les bases de données fermées : Les fichiers FASTQ et FASTA sont conservés dans la base de données génomique du CNRVC qui est localisée dans Gaïa, un serveur sécurisé et sauvegardé de l'Institut Pasteur.

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : Il est prévu que tous les fichiers FASTQ produits en 2024 par le CNRVC soient déposés sans métadonnées sur ENA au cours de l'année 2025.

2.7 Partage de séquences produites par le CNR

La gestion des séquences Illumina produites (FASTQ) par le CNRVC est en train d'être modifiée pour qu'elles soient déposées systématiquement dans les bases de données. Les séquences de 2024 seront ainsi mises à disposition dans l'European Nucleotide Archive (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>), sans information épidémiologique cependant, courant 2025, avec partage immédiat. Les séquences (FASTQ) des souches des années précédentes vont être déposées au fur et à mesure. Les données sur les souches seront disponibles dans les publications scientifiques décrivant ces génomes. Les fichiers FASTA annotés (pour les plasmides ou les génomes circularisés) seront déposés dans GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) avec partage immédiat lors d'une publication.

3. Activités de surveillance

- **126 souches** issues des **221 cas de choléra diagnostiqués à Mayotte** entre **mars et juillet 2024** ont été analysées au CNRVC. De plus 28 prélèvements de Mayotte, ont été reçus pour des confirmations moléculaire du diagnostic.

- **Cinq cas de choléra** ont été déclarés en **France métropolitaine** en 2024. Les 5 cas étaient dus à des souches du séro groupe O1 de la lignée 7PET et étaient importés d'Asie.

- **180 cas cliniques d'infections à VNC** (dont quatre co-infections) ont été confirmés via l'analyse de **176 souches isolées et de 8 diagnostics par biologie moléculaire** uniquement. Les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* étaient prépondérantes. La tendance à l'augmentation des cas d'infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139 débutée en 2022 s'est confirmée en 2024. Il s'agissait majoritairement de gastro-entérites (95% des cas), importées de l'étranger dans 61% des cas. Deux souches de *V. cholerae* O1 non toxigène également associées à des cas de gastro-entérites ont été isolées en 2024 (comme en 2023). Un doublement du nombre de cas d'infections à *V. parahaemolyticus* a été observé avec 96 cas en 2024 contre 49 cas en 2023. La totalité des cas liés à cette espèce étaient des gastro-entérites, acquises en France métropolitaine dans 75% et avec un lien avec une consommation de produits de la mer dans 60% des cas. Huit cas d'infections à *V. fluvialis* ou *V. furnissii* (100% de cas importés ou provenant d'Outre-mer) ont été diagnostiqués, confirmant comme en 2022 et 2023 l'émergence de cette espèce comme agent étiologique de gastro-entérites. Enfin, les souches provenant de trois cas sévères d'infections cutanées à *V. vulnificus* ont été transmises au CNRVC.

3.1 Description du réseau de partenaires

○ Description des partenaires, répartition par type d'activités

Le recensement des cas se fait sur la base des déclarations volontaires de la part des biologistes ou bien dans le cadre d'une Déclaration Obligatoire (DO) pour le choléra. Les souches sont envoyées au CNRVC par les laboratoires hospitaliers en lien avec les cas graves, hospitalisés, d'infections à vibrions, mais également par des laboratoires de biologie médicale de ville (LBM), de plus en plus regroupés en plateformes de biologie médicale. La répartition des échantillons envoyés par ces 2 types de laboratoire est présentée dans le **Tableau 5**.

De plus en plus fréquemment, les laboratoires privés et hospitaliers utilisent en première intention des PCR syndromiques dans le diagnostic des gastro-entérites, permettant la détection de *Vibrio* sp., en particulier le kit Allplex GI qui inclut la recherche de *Vibrio* sp. Cependant, l'ajout dans le dernier Référentiel en microbiologie Médicale (REMIC v7) de 2022 de la recherche obligatoire des EHEC, oriente maintenant les laboratoires vers le kit Allplex EB qui n'inclut pas la recherche de *Vibrio* sp., ce qui pourrait à nouveau conduire à une moindre détection des infections à *Vibrio* sp. De plus, la plupart des laboratoires ne disposant pas de milieux sélectifs permettant l'isolement des souches de *Vibrio* sp., le CNRVC reçoit de plus en plus souvent des prélèvements de selles pour effectuer l'isolement après un résultat positif en PCR.

Tableau 5 : Échantillons d'origine clinique reçus de France par type de laboratoires expéditeurs en 2024 (hors épidémie de choléra à Mayotte)

Type de laboratoire	Nombre d'échantillons reçus	Nombre de correspondants
CH/CHU	67	37
LBM	148	35
Total	215	72

LBM : laboratoire de biologie médicale ; CHU : centre hospitalier universitaire ; CH : centre hospitalier

○ Définition de l'échantillon de souches isolées

Les souches ont été isolées de sujets infectés par un vibron, dont la pathologie s'est déclarée sur le territoire français, et pour lesquels l'identification du germe responsable a été effectuée ou confirmée par le CNRVC. Les cas pour lesquels l'exposition a été documentée sur le territoire français sont considérés comme des cas autochtones, ceux pour lesquels l'exposition a été documentée à l'étranger comme des cas importés.

○ Répartition géographique, estimation de la couverture du réseau, évolution du réseau

Le CNRVC collabore avec des laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire, avec un nombre de correspondants nettement plus élevé dans les régions côtières, en particulier sur la façade Atlantique. Cette tendance avait été observée dès 1995. Le nombre de correspondants a évolué de façon notable suite à la sensibilisation faite par le CNRVC, qui avait activement sollicité les biologistes en 2011 en réalisant une campagne d'information et sensibilisation par le biais d'un contrôle qualité réalisé sur l'ensemble de la France auprès de 3281 laboratoires participants, et avait à cette occasion incité les laboratoires à envoyer leurs souches sur la base du volontariat et suite à l'évolution récente des méthodes de diagnostic. Les PCR multiplex syndromiques et la spectrométrie de masse permettent de s'orienter plus facilement sur un diagnostic *Vibrio* que les méthodes de bactériologie traditionnelles et d'améliorer ainsi l'exhaustivité du recueil de ces infections, en particulier par une meilleure détection des cas peu symptomatiques, non hospitalisés. Ces techniques présentent en effet l'avantage d'attirer l'attention des biologistes sur ces agents pathogènes, et le CNRVC est régulièrement contacté par des professionnels de santé, suite à un signal *Vibrio* positif en PCR, ce qui représente une occasion supplémentaire de les sensibiliser à ces infections, également de leur demander une participation active à la surveillance.

En 2024, 72 correspondants ont été recensés. A noter que les souches isolées dans le département de la Gironde, qui représente le plus grand nombre de cas enregistrés au CNRVC, sont envoyées quasi exclusivement par le plateau technique Cerballiance Nouvelle Aquitaine. Une collaboration entre ce laboratoire et le CNR a été entreprise depuis 2024 pour améliorer le pourcentage d'isolement des souches de vibrons après une PCR syndromique positive dans ce laboratoire.

Le suivi de la positivité des PCR syndromiques (Allplex GI) et des cultures de ce laboratoire montre une légère augmentation du taux de positivité avec 0,16% de PCR positive à *Vibrio sp.* en 2023 versus 0,23% en 2024 et 0,08% de culture à *Vibrio sp* positive en 2023 versus 0,16% en 2024. Ce laboratoire ayant effectué plus de 20 000 recherches sur 2023 et 2024.

Avec l'aide de ce laboratoire, un réseau de surveillance microbiologique des infections à *Vibrio sp.* est en cours d'organisation depuis le début de 2025.

La répartition géographique des échantillons reçus au CNRVC en 2024 et la comparaison avec les années précédentes sont présentées dans les **Figures 1 et 2** : la **Figure 1** détaille l'évolution du nombre d'échantillons reçus en fonction des laboratoires correspondants (majoritairement des plateaux techniques pour les LBM) et la **Figure 2** le nombre d'échantillons reçus en fonction du code postal patient ou code postal laboratoire préleveur. En effet, du fait de l'existence de plateaux techniques (nommés **laboratoires correspondants** dans la **Figure 1** car nous envoyant la souche ou le prélèvement) réalisant les analyses bactériologiques pour de nombreux LBM (nommés **laboratoires préleveurs** dans la **Figure 2** car réalisant le prélèvement initial) dans une zone géographique plus ou moins large, la prise en compte seulement du laboratoire correspondant peut biaiser la répartition géographique des cas. Nous observons cela notamment pour le plateau technique de Gironde qui traite les prélèvements de nombreux cas d'infections par VNC, cas initialement prélevés dans des LBM localisés de Biarritz à La Rochelle. Le code postal du laboratoire préleveur ou du patient est donc à privilégier pour considérer la répartition des cas mais cette information n'est pas toujours disponible lorsqu'un plateau technique transmet un échantillon.

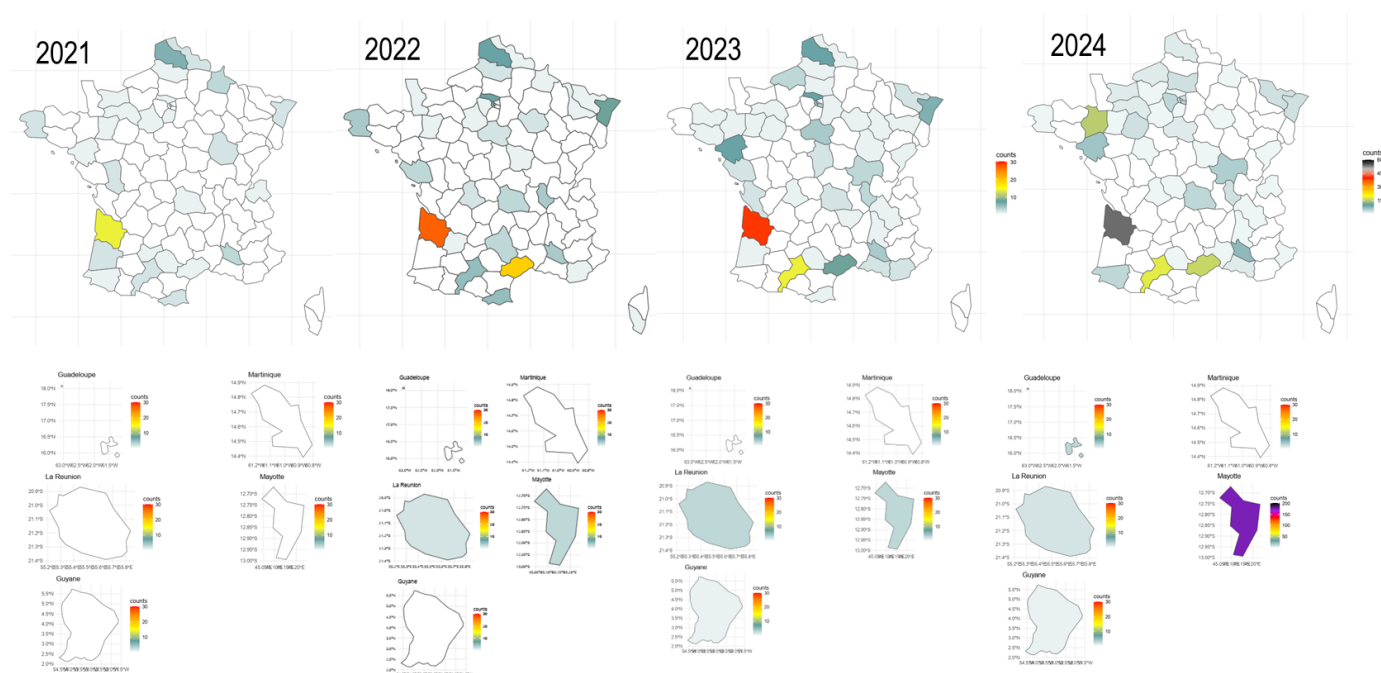


Figure 1. Nombre et origine géographique des échantillons d'origine humaine envoyés par les laboratoires correspondants et reçus au CNRVC de 2021 à 2024

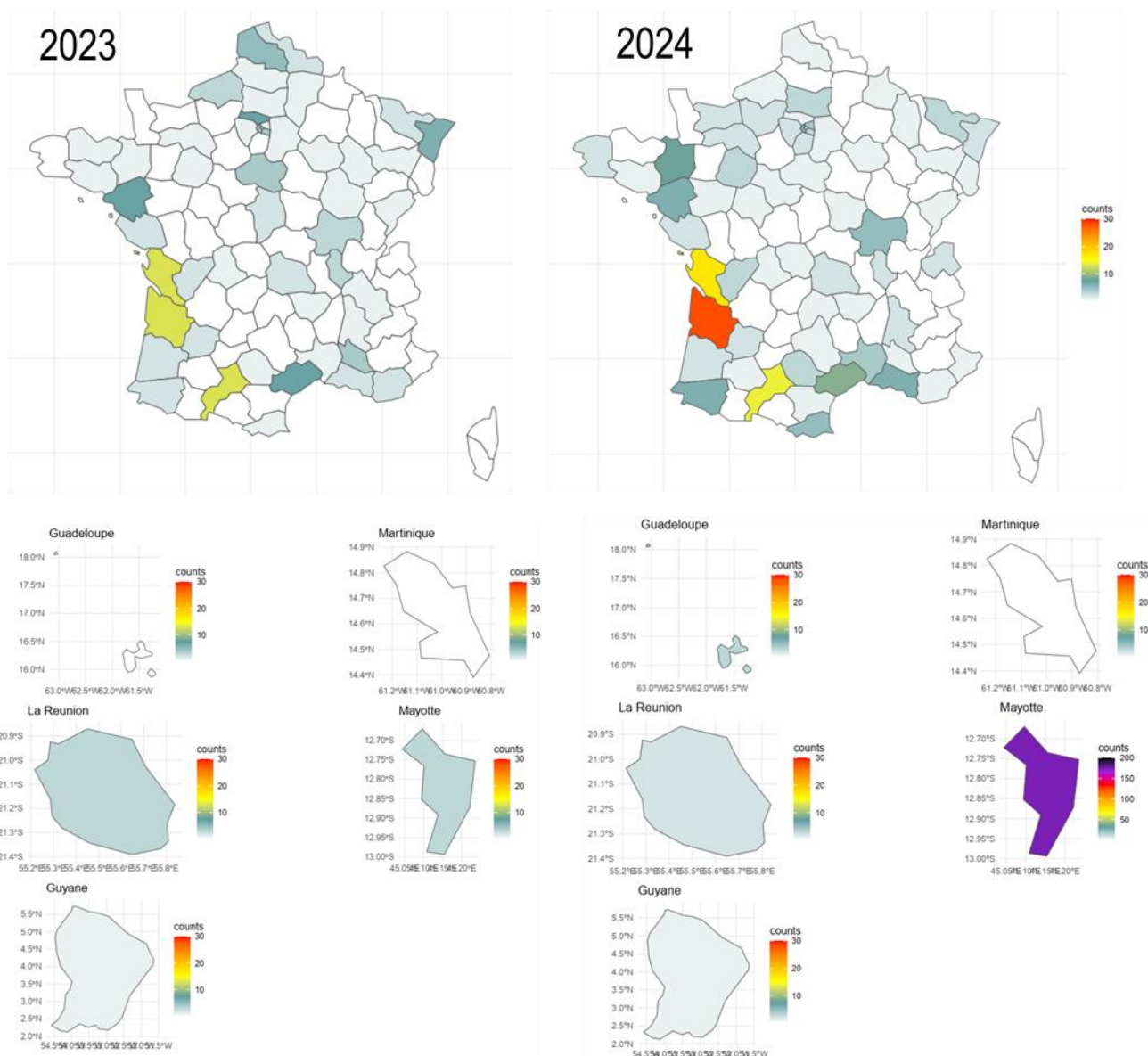


Figure 2. Nombre et origine géographique des échantillons d'origine humaine envoyés par les laboratoires préleveurs reçus au CNRVC en 2023 et 2024

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

○ Vibron cholérique

Le choléra est une infection bactérienne due à *V. cholerae* O1 ou O139, toxinogène, appartenant à la lignée 7PET responsable de la pandémie actuelle. L'infection s'acquiert après ingestion d'un inoculum important de vibrions via de l'eau ou des aliments contaminés et peut se manifester sous une forme sévère, diarrhées aqueuses aiguës, fréquentes et abondantes, vomissements, conduisant rapidement à une déshydratation entraînant la mort dans 25 à 50% des cas en l'absence de traitement ou en cas de traitement inadapté. Cependant moins de 10% des cas présentent ces symptômes typiques et les cas peu symptomatiques mimant une gastro-entérite banale représentent la forme la plus fréquente de l'infection. Les cas de choléra sont généralement associés à une notion de voyage en zone d'endémie ou d'épidémie cholérique. La possibilité d'évolution rapide des cas vers une forme clinique grave justifie l'investigation systématique autour des cas. La 7ème pandémie de choléra a débuté en Indonésie en 1961 et depuis 2022 une résurgence a été signalée par l'OMS au niveau mondial.

Evolution du nombre de cas d'infections : aucun cas de choléra n'avait été rapporté en 2020 et 2021, sept cas ont été rapportés en 2022, deux cas en 2023 et cinq cas en 2024 (importés en France métropolitaine). L'évolution du nombre de cas est présentée sur la **Figure 3**.

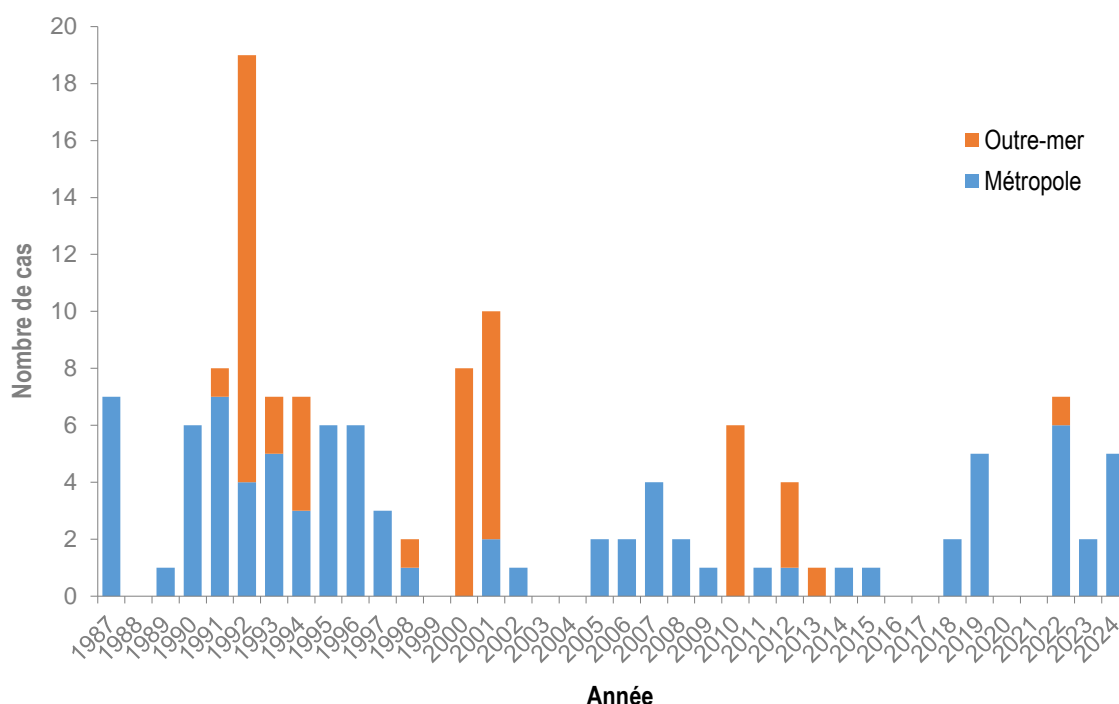


Figure 3. Nombre de cas de choléra déclarés sur le territoire français entre 1987 et 2024*

**hors épidémie de Mayotte en 2024 (221 cas confirmés ou probables dont 126 souches confirmées par le CNRVC)*

Origine géographique des lieux de contamination : les cinq cas de choléra diagnostiqués en France métropolitaine en 2024 étaient de retour d'Asie du Sud : 4 cas de retour d'Inde (CNRVC240029, CNRVC240034, CNRVC240086, CNRVC2400363) et 1 cas de retour du Pakistan (CNRVC240249).

Aspects cliniques, épidémiologiques et microbiologiques des infections : Trois cas ont été hospitalisés dont un en réanimation. Les patients avaient entre 2 et 68 ans et il n'a pas été rapporté de cas de transmission secondaire dans leurs entourages. Cependant dans le cas de l'enfant de 2 ans la notion d'autres personnes malades dans la famille a été retrouvée, sans que des prélèvements n'aient été effectués. Les vibrions cholériques étaient des souches de *V. cholerae* séro groupe O1, sérotype Ogawa pour les cinq souches isolées, porteuses des gènes de la toxine cholérique et appartenant à la lignée 7PET.

Epidémie de choléra à Mayotte en 2024

Le 18 mars 2024 un premier cas de choléra a été diagnostiqué à Mayotte, importé des Comores voisines où une épidémie avait débuté en février 2024. Le 22 avril 2024, un premier cas de contamination locale (cas autochtone) a été décrit. Au total, 221 cas ont été répertoriés.

Cent vingt-six souches (126) issues des 221 cas décrits à Mayotte ont été envoyées pour expertise au CNRVC. Parmi celles-ci, 109 étaient issues de cas autochtones, 8 de cas importés des Comores et 6 de cas importés de Tanzanie. Toutes les souches ont été confirmées comme étant des *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor possédant le gène *ctxA* codant pour la toxine cholérique et appartenant à la lignée de la 7^{ème} pandémie (ST69). La phylogénie nous a permis d'identifier que ces souches appartenaient à la sous-lignée AFR13 et étaient dérivées de souches isolées au Yémen en 2019, au Liban en 2022 et au Kenya en 2023 ; elles étaient porteuses d'un plasmide IncC de multi-résistance aux antibiotiques identique à 100% avec celui des souches du Yémen, Liban et Kenya. L'étude phylogénétique a confirmé l'importation récente de cette souche (sous-lignée AFR13) à partir d'Afrique de l'Est aux Comores et à Mayotte et a exclu l'hypothèse de la résurgence d'une souche déjà présente localement puisque les souches de la précédente épidémie de choléra à Mayotte en 2000 (10 cas) appartenaient à la sous-lignée AFR10. L'analyse des 126 souches de l'épidémie, appartenant aux différents foyers sur l'île, sur une phylogénie de plus de 1500 souches de *V. cholerae* O1 El Tor de la 7^{ème} pandémie a également permis de vérifier qu'il n'y avait pas eu d'introduction d'autres souches au cours de l'épidémie, toutes appartenant au même cluster de la sous-lignée AFR13 porteuse du plasmide IncC.

Nous avons publié la diffusion importante de cette souche de choléra hautement résistante aux antibiotiques, depuis le Yémen en passant par le Moyen Orient et l'Afrique de l'Est, en décembre 2024 (cf paragraphe publications). Les caractéristiques de l'épidémie de choléra à Mayotte ainsi que les caractéristiques cliniques des patients admis en réanimation lors de cette épidémie ont également été publiées, en 2024 pour l'épidémiologie (cf paragraphe publications) et en 2025 pour les cas de réanimation (Boué Y, Niang M, Lapostolle A, Chamouine A, Benoit Cattin T, Favre M, Rouard C, Mortier C, Piarroux R, Carvelli J; CHOLEMAY Study Group : Cholera outbreak in Mayotte (France): A retrospective description of 16 patients treated for hypovolemia in the ICU. Infect Dis Now. 2025).

○ Vibrions non cholériques

Les vibrions non cholériques (VNC) d'intérêt médical sont à l'origine d'infections sporadiques, gastro-entérites, infections suppuratives, bactériémies, plus rarement de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). La consommation de produits de la mer et le contact direct avec le milieu marin sont les deux voies majeures de contamination. Les voyages dans les pays où les normes en matière d'hygiène et d'assainissement peuvent faire défaut ont été identifiés comme un risque supplémentaire d'exposition pour les infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139, cette espèce bactérienne pouvant transiter par les eaux usées d'origine domestique, utilisées parfois pour l'irrigation.

Evolution du nombre de cas d'infections : 180 cas d'infections à vibrions non cholériques ont été confirmés ou diagnostiqués au CNRVC en 2024, confirmant l'augmentation du nombre de cas observée depuis 2017 (**Figure 4**). Cette augmentation pourrait être liée à l'utilisation de plus en plus importante des PCR syndromiques par les laboratoires de biologie médicale privés, en particulier du kit Allplex GI qui comprend plusieurs cibles pour les

Vibrio sp, également au réchauffement climatique pour *V. parahaemolyticus* comme le montre la légère augmentation dans les chiffres de Cerballiance Nouvelle Aquitaine entre 2023 et 2024 (cf paragraphe 3.1).

Dans 19 cas, une notion de cas groupés a été rapportée mais sans que les prélèvements des autres patients symptomatiques n'aient été envoyés au CNRVC.

Aspects cliniques, épidémiologiques et microbiologiques des infections : la distribution des différents types d'agents caractérisés, les syndromes cliniques et le contexte épidémiologique des infections sont présentés dans le **Tableau 6**.

- L'âge moyen des cas était de 50 ans (de 4 mois à 88 ans), 50% des cas étaient des hommes et 50% des femmes.
- Parmi les terrains prédisposants ont été considérés : âges extrêmes, antécédents de pathologies digestives, immunosuppression, cancer/hémopathie, hépatopathie, traitement anti-acide, diabète, plaies préexistantes.

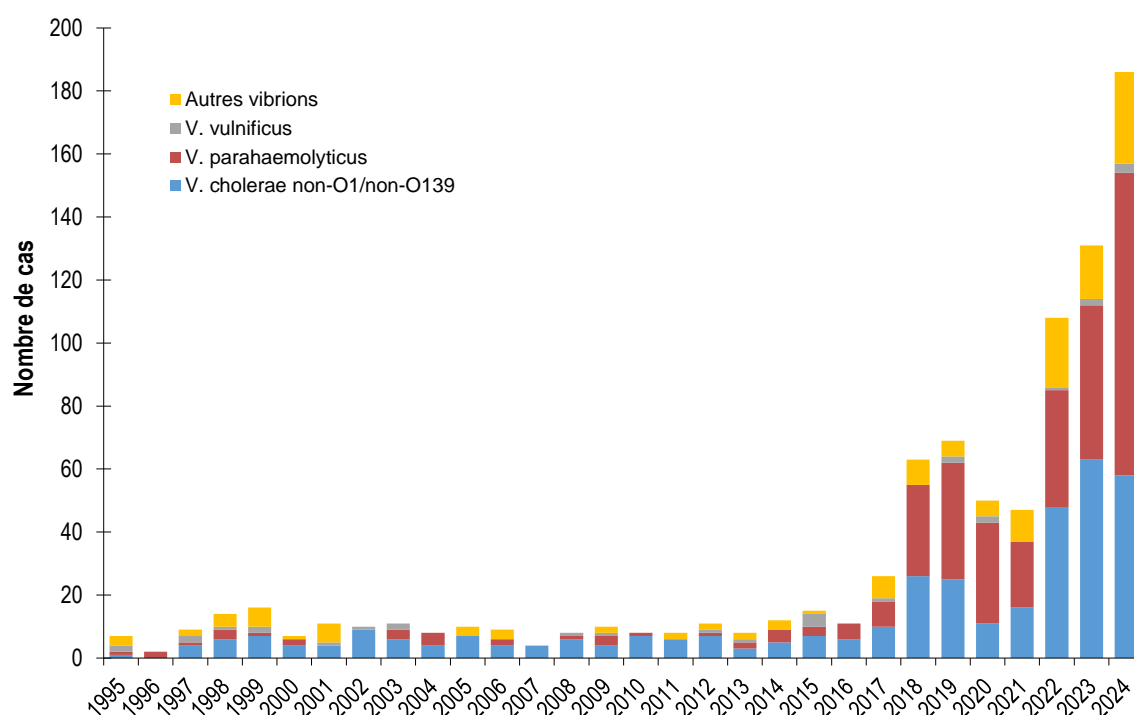


Figure 4. Evolution du nombre d'infections à vibrions non cholériques de 1995 à 2024

V. cholerae

- Les infections à *V. cholerae* non cholériques comprennent les infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139 (VcNN) (n=54) ainsi que les infections à *V. cholerae* O1 non toxigène (VcO1NT) (n=3). Les souches ont pu être isolées pour 48 infections à VcNN et 2 infections à VcO1NT.
- *Présentations cliniques* : l'espèce *V. cholerae* a été majoritairement associée à des gastro-entérites, ainsi qu'à 3 infections sévères : 2 bactériémies et 1 infection du liquide d'ascite chez des patients avec des facteurs favorisants.
- *Origine géographique des lieux de contamination* : soixante et un pourcent (61%) des cas d'infections à *V. cholerae* non cholérique ont été contractés à l'étranger, 18% dans les territoires d'Outre-mer et 21% en France métropolitaine. Les cas importés étaient majoritairement (40%) liés à la consommation de crudités à l'étranger (Maghreb +++, Indonésie, Kenya, Madagascar, Tanzanie ...). Trois cas d'infections à *V. cholerae* O1 non toxigènes ont été observés en France en 2024 (deux cas en 2023), alors que de telles souches avaient rarement été isolées les années précédentes. Deux cas étaient importés (Tanzanie, Kenya) alors que le 3^{ème} était un cas autochtone. La Tanzanie et le Kenya déclarant des cas de choléra, ces cas soulignent

l'importance de la réalisation de la recherche de la toxine cholérique pour infirmer ou confirmer un cas de choléra après identification d'un *V. cholerae* O1.

- **Saisonnalité des infections** : les cas d'infections à *V. cholerae* non cholériques sont globalement répartis sur toute l'année (en lien avec le fait que la majorité des cas sont importés ou acquis en Outre-mer). Une saisonnalité est notée pour les cas acquis en France métropolitaine en juillet, août et septembre.
- **Facteurs de pathogénicité** :
 - Treize souches possédant le gène *ctxA*, codant la cholix-toxine (considérée comme un facteur de pathogénicité de l'espèce) ont été isolées. Il n'a pas été observé cependant de corrélation entre la présence de ce gène de toxine et le type (intestinal ou extra-intestinal) ou la gravité des infections.
 - Toutes les souches possédaient le gène de l'hémolysine *hlyA*, initialement associé au pouvoir invasif de l'espèce, mais retrouvé chez la quasi-totalité des souches d'origine clinique et environnementale.
 - Aucune souche de VcNN porteuse des gènes codant pour la toxine cholérique n'a été identifiée en France en 2024.

V. parahaemolyticus

- 96 cas d'infections à *V. parahaemolyticus* ont été observés en 2024, ce qui constitue un doublement du nombre de cas par rapport à 2023 (n=49). Un cas a été diagnostiqué uniquement par biologie moléculaire. Tous les cas pour lesquels les souches ont été transmises au CNRVC étaient des gastro-entérites. Comme pour les cas d'infections à VcNN cette augmentation est observée depuis 2017 mais a été particulièrement importante en 2024 (**Figure 5**).
- **Origine géographique des lieux de contamination** : la contamination de 75% des cas avait eu lieu en France métropolitaine en 2024 dont une très grande majorité sur la côte atlantique en lien avec la consommation de produits de la mer crus (en particulier des huîtres) (**Figure 6**).
- **Saisonnalité des infections** : la saisonnalité des infections a été confirmée pour les cas autochtones, contractés durant les mois les plus chauds de l'année : juin à octobre, avec un pic très marqué en juillet et août (**Figure 7**).
- **Facteurs de pathogénicité** :
 - La majorité (89,5%, 85/95) des souches de *V. parahaemolyticus* possédaient les gènes des hémolysines TDH et/ou TRH, classiquement associées au pouvoir pathogène de l'espèce.
 - Dix souches importées appartenaient au ST3 (clones pandémiques de l'espèce) avec la présence de 2 gènes de l'hémolysine TDH (2 allèles différents) et du système de sécrétion de type 3 (T3SS2).
 - Une autre souche n'appartenant pas au ST3 possédait les gènes codant pour le T3SS2.
 - Les gènes codant pour le T3SS1 étaient quant à eux présents chez la totalité des souches
- Deux ST majoritaires ont été retrouvés parmi les souches de *V. parahaemolyticus* isolées en France métropolitaine de cas autochtones
 - ST1031 (trh+) (n=29), isolé sur toute la côte atlantique
 - ST2715 (tdh+ trh+) (n=14), étroitement lié au département 33

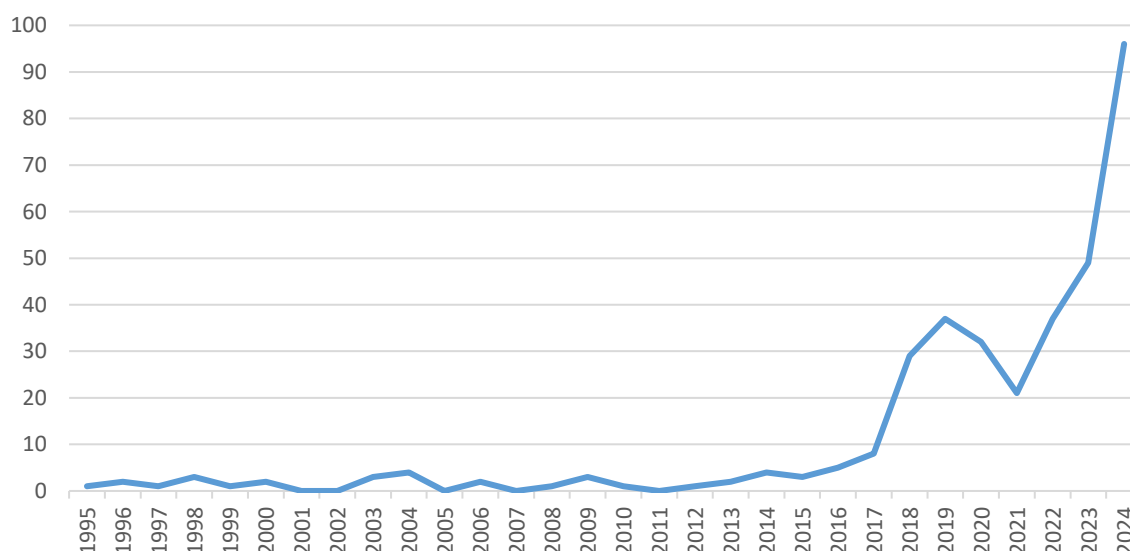


Figure 5. Evolution du nombre d'infections à *V. parahaemolyticus* de 1995 à 2024

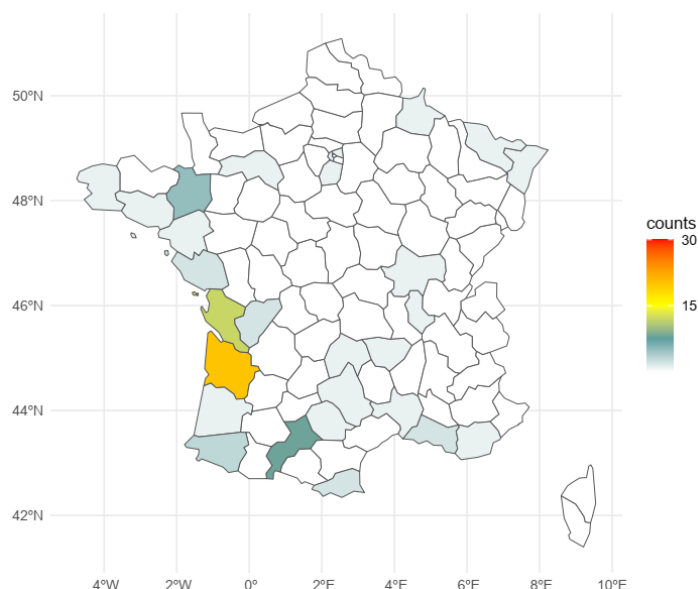


Figure 6. Répartition géographique des cas autochtones d'infection à *V. parahaemolyticus* en France métropolitaine en 2024

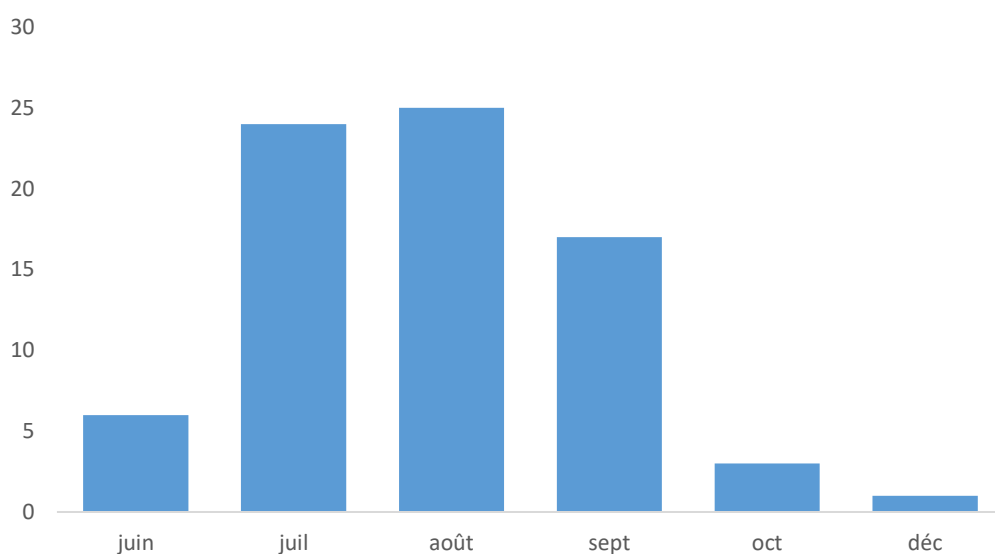


Figure 7. Saisonnalité des cas autochtones d'infection à *V. parahaemolyticus* en France métropolitaine en 2024

V. alginolyticus* / *V. diabolicus

- Nous avons pu montrer en 2024 qu'il existe parmi les souches isolées d'infections cliniques des souches de *V. alginolyticus* et des souches de *V. diabolicus*. Ces deux espèces sont indistinguables par le Maldi-ToF ou par notre technique d'identification par PCR basée sur le gène de la collagénase. Cependant sur les résultats de WGS les données d'analyse par « Average Nucleotide Identity » (ANI), par l'outil taxonomique Kraken ou par Ribosomal Multilocus Sequence Typing (rMLST) permettent de les dissocier.
- Habituellement les souches de *V. alginolyticus* sont plutôt associées à des otites et des infections cutanées en France. Cette année les 7 souches ont été isolées de gastro-entérites (2 souches de *V. alginolyticus* et 5 souches de *V. diabolicus*). Trois de ces infections étaient des co-infections avec des souches de *V. parahaemolyticus* ou *V. fluvialis* ce qui ne permet pas d'affirmer leur implication dans la pathologie.

V. vulnificus

- Trois cas d'infections cutanées sévères à *V. vulnificus* ayant nécessité des interventions chirurgicales lourdes ont été identifiés au CNRVC, un cas ayant entraîné un décès (bactériémie). Tous les cas faisaient suite à une surinfection de plaie après contact avec le milieu marin. Deux des patients présentaient des terrains favorisants, aucun terrain n'a été retrouvé pour le 3^{ème} patient en dehors d'une dénutrition.
- Les infections à *V. vulnificus* ne sont pas à déclaration obligatoire en France et l'une des souches n'a été reçue au CNRVC que suite à la demande directe de la famille d'un patient, ce qui nous a permis de contacter le laboratoire de l'hôpital et de récupérer la souche isolée. L'exhaustivité totale de ces cas graves en France ne peut donc être garantie. Le nombre d'infections à *V. vulnificus* rapporté au CNRVC est compris entre 0 et 2 cas depuis 1995.

Autres espèces de *Vibrio* sp.

- Une souche de *V. mimicus*, espèce très proche de *V. cholerae*, porteuse du gène *ctxA* codant pour la toxine cholérique a été isolée en 2024, à l'origine d'une gastroentérite. De telles souches sont rapportées dans la littérature mais très rarement isolées de cas humains. Il s'agissait d'une infection acquise sur le territoire français.
- Un cas rare d'infection persistante à *V. metschnikovii* (gastro-entérite) a été observé en 2024 chez un patient présentant un terrain favorisant.
- Une souche de *V. harveyi*, espèce pour laquelle de rares cas cliniques, essentiellement des surinfections de plaies, ont été rapportés, a été isolée d'otite. Une souche avait été identifiée au CNR en 2022, isolée d'une surinfection de plaie faisant suite à un contact avec l'eau de mer, mais son association avec *V. alginolyticus* n'avait pas permis d'affirmer son implication comme agent étiologique dans ce cas d'infection.

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

○ ***Vibrio cholerae* O1 toxinogène**

Les cinq souches isolées en France en 2024 appartenait à la lignée 7PET. Quatre souches présentaient un profil de résistance aux antibiotiques identiques et une souche un profil différent en lien avec la perte de plusieurs gènes de résistance (secondaire à une délétion de l'élément SXT/R391) (**Tableau 7**). Les 126 souches isolées à Mayotte présentaient un profil différent des 5 souches isolées en France métropolitaine. Un antibiogramme est donc absolument nécessaire pour déterminer la sensibilité des souches.

Parmi les 126 souches isolées à Mayotte, 67 ont été testées par antibiogramme phénotypique (diffusion en milieu gélosé et CMI en microdilution). Le résistome a été analysé sur la totalité des 126 souches. Les résistances phénotypiques étaient identiques sur les 67 souches testées avec un phénotype de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) lié au gène *bla_{PER-7}* présent sur le plasmide IncC. Les souches présentaient également une résistance à l'azithromycine avec des CMI entre 32 et 128 mg/L (en lien avec les gènes *mph(A)*, *mph(E)* et *msr(E)* présents sur le plasmide IncC), une résistance à la ciprofloxacine (CMI à 0,5 mg/L), une résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole (CMI à 16 mg/L) et aux nitrofuranes. Toutes les souches restaient sensibles aux tétracyclines (**Tableau 7**).

Tableau 7. Résistance aux antibiotiques des souches cliniques de *V. cholerae* O1 de la 7ème pandémie isolées en France en 2024

Antibiotique	Nombre de souches résistantes <i>importé en France métropolitaine</i>		Pourcentage de souches résistantes <i>à Mayotte</i>	
	n = 5	Résistome	n = 126	Résistome
Ampicilline **	0		100%	<i>bla_{PER-7}</i>
Céfotaxime *	0		100%	<i>bla_{PER-7}</i>
Péfloxacin *	5	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S85L)	100%	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S85L)
Ciprofloxacine (CMI) *	5	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S85L)	100%	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S85L)
Erythromycine *	0		100%	<i>mph(A)</i> <i>mph(E)</i> <i>msr(E)</i>
Azithromycine *	0		100%	<i>mph(A)</i> <i>mph(E)</i> <i>msr(E)</i>
Triméthoprim **	5	<i>dfrA1</i>	100%	<i>dfrA1</i>
Triméthoprim-sulfaméthoxazole (CMI) *	4	<i>dfrA1</i> + <i>sul2</i>	100%	<i>dfrA1</i> + <i>sul2</i>
Tétracycline *	0		0	
Nitrofuranes *	5	VC0175 (R169C), VCA0637 (Q5stop)	100%	VC0175 (R169C), VCA0637 (Q5stop)

Le rendu des résultats est basé sur la méthode de diffusion en milieu solide (la corrélation avec la méthode Sensititre (CMI) a été réalisée pour certains antibiogrammes). Le rendu de la sensibilité à la ciprofloxacine est effectué suite à la détermination de la CMI.

* : Interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2024 pour les *Vibrio* sp.

** : Interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2024 pour les entérobactériales

○ **Vibrions non cholériques**

Les souches de VNC restaient globalement très sensibles aux antibiotiques. Les résistances observées phénotypiquement étaient corrélées avec le résistome (issu de l'analyse génomique des gènes de résistance) pour les souches de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae*. La résistance aux antibiotiques des principales espèces de VNC isolées en 2024 est présentée dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Résistance aux antibiotiques des principales espèces de souches cliniques de vibriens non cholériques isolées en France en 2024

Antibiotique	Nombre de souches résistantes				
	<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 \square	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. diabolicus</i>	<i>V. fluvialis</i> <i>V. furnisii</i>	<i>V. vulnificus</i>
	n = 50	n = 95	n = 18	n = 8	n = 3
Ampicilline ** (£)	5	88 (3)	18	6	0
Pipéracilline-Tazobactam *	1	1	0	8	0
Céfotaxime *	1	0	0	2 \$	0
Péfloxacine *	8	0	0	1	0
Ciprofloxacine (CMI) *	6	0	0	1	0
Erythromycine *	0	0	0	0	0
Azithromycine *	0	0	0	0	0
Triméthoprim-sulfaméthoxazole (CMI)*	6	0	0	1	0
Tétracycline *	2	0	0	0	0

Le rendu des résultats est basé sur la méthode de diffusion en milieu solide (la corrélation avec la méthode sensitière (CMI) a été réalisée pour certains antibiogrammes). Le rendu de la sensibilité à la ciprofloxacine est effectué suite à la détermination de la CMI.

* : Interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2024 pour les *Vibrio* sp.

** : Interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2024 pour les entérobactériales

\$: CMI supérieure strictement à 0,25 mg/L (les concentrations critiques du CASFM-EUCAST ne s'appliquent pas pour *V. fluvialis*)

(£) : nombre de souches présentant un diamètre proche du diamètre critique

\square : y compris les 2 souches de *V. cholerae* O1 non toxigène

V. cholerae

Sur les douze souches originaires de France métropolitaine, une seule souche était résistante au triméthoprim du fait de la présence d'un gène *dfrA*. Les 38 souches provenant de l'étranger ou de l'Outre-mer possédaient plus de résistances aux antibiotiques. Parmi celles-ci, 5 souches étaient résistantes à l'ampicilline du fait de la présence d'un gène *bla_{CARB}* pour 4 d'entre elles et d'un gène *bla_{CMY-4}* pour une souche, lui conférant également une résistance au céfotaxime. Six souches étaient résistantes à la ciprofloxacine (CMI comprises entre 0,5 et 2 mg/L) via des mutations dans les gènes chromosomiques *gyrA* (S83I) et *parC* (S85L). Les souches ayant les CMI les plus élevées étaient celles possédant également un gène *qnrVc*. En l'absence de *qnrVc*, la CMI de la souche était juste supérieure à la concentration critique de 0,25 mg/L. A noter que 12 souches au total portaient uniquement un gène *qnr*. Chez ces souches, le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de péfloxacine était diminué mais elles restaient toujours catégorisées comme sensibles avec des CMI vis-à-vis de la ciprofloxacine comprises entre 0,015 et 0,12 mg/L contre $\leq 0,008$ mg/L pour les souches sensibles sans *qnr*. Quatre souches possédaient uniquement la mutation S83I dans le gène *gyrA*. Chez ces souches le diamètre de la péfloxacine était proche du diamètre critique mais elles restaient toujours catégorisées comme sensibles. La CMI de la ciprofloxacine était comprise entre 0,12 et 0,25 mg/L juste en dessous du breakpoint de 0,25 mg/L. Six souches étaient résistantes au cotrimoxazole en lien avec une combinaison de gènes *dfrA* et *sul* pour cinq d'entre elles. Huit souches présentaient uniquement un gène *dfrA* entraînant la résistance au triméthoprim. Le relèvement du diamètre critique du cotrimoxazole de 18 à 21 mm depuis le CASFM-EUCAST 2023 pour *Vibrio* spp. fait dorénavant catégoriser une souche ayant un gène de résistance de type *dfrA* parmi les souches résistantes. Cependant, l'utilisation de la nouvelle concentration critique du cotrimoxazole donnée dans le CASFM-EUCAST 2023 (résistance si > 0,25 mg/L et sensibilité si $\leq 0,25$ mg/L) catégorise ces souches contenant *dfrA* comme sensibles (CMI comprises entre 0,125

et 0,25 mg/L). Deux souches étaient résistantes à la tétracycline et à la doxycycline du fait de l'acquisition d'un gène *tet*.

Il n'a pas été observé d'évolution de la résistance aux antibiotiques d'intérêt ces dernières années (cf. **Tableau 9**).

Tableau 9. Evolution de la résistance aux antibiotiques des souches cliniques de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées en France entre 2018 et 2024

Antibiotique	Nombre (pourcentage) de souches résistantes						
	2018 n = 26	2019 n = 24	2020 n = 11	2021 n = 16	2022 n = 48	2023 n = 63	2024 n = 50
Ampicilline **	0	2 (8)	0	2 (13)	5 (10)	7 (11)	5 (10)
Céfotaxime *	0	0	0	0	0	0	1 (2)
Acide nalidixique ***	8 (31)	5 (21)	1 (9)	4 (25)	10 (21)	12 (19)	8 (16)
Ciprofloxacine (CMI) *	3 (12)	2 (8)	0	4 (25)	9 (19)	12 (19)	6 (12)
Erythromycine *	0	0	0	0	0	1 (2)	0
Azithromycine *	0	0	0	0	0	0	0
Triméthoprim- sulfaméthoxazole (CMI) *	4 (15)	4 (17)	1 (9)	4 (25)	6 (13)	4 (6)	6 (12)
Tétracycline *	4 (15)	3 (13)	1 (9)	3 (19)	3 (6)	3 (5)	2 (4)

Le rendu des résultats est basé sur la méthode de diffusion en milieu solide (la corrélation avec la méthode sensible (CMI) a été réalisée pour certains antibiogrammes. Le rendu de la sensibilité à la ciprofloxacine est effectué suite à la détermination de la CMI.

* : Interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2024 pour les *Vibrio* sp.

** : Interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2024 pour les entérobactériales

*** : Le dépistage de la résistance aux fluoroquinolones était effectué à l'aide de l'acide nalidixique préalablement, ce sont donc ces résultats qui sont présentés pour la comparaison de l'évolution de la résistance

V. parahaemolyticus

Quatre-vingt-onze (91) des 95 souches présentaient une résistance modérée à l'ampicilline en lien avec la présence d'un gène de bêta-lactamase de type *bla*_{CARB}. Différents types de gènes *bla*_{CARB} sont retrouvés dans les souches et sont corrélés au ST (type MLST) des souches. Toutes les souches restaient sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites : fluoroquinolones, tétracyclines, azithromycine et cotrimoxazole (triméthoprim-sulfaméthoxazole) ainsi qu'aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G). Ce phénotype de résistance reste identique à celui des années précédentes.

V. alginolyticus* et *V. diabolicus

La totalité des souches présentaient une résistance modérée à l'ampicilline en lien avec la présence d'un gène de bêta-lactamase de type *bla*_{CARB}. Les espèces *V. alginolyticus* et *V. diabolicus* présentaient deux types différents de gènes *bla*_{CARB}. Toutes les souches restaient sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites : fluoroquinolones, tétracyclines, azithromycine et cotrimoxazole (triméthoprim-sulfaméthoxazole) ainsi qu'aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G). Ce phénotype de résistance reste identique à celui des années précédentes.

V. fluvialis* et *V. furnissii

Les souches de ces deux espèces présentaient des résistances variables aux pénicillines et céphalosporines sans lien avec des gènes de résistances connus retrouvés dans le génome.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Le CNRVC communique avec Santé publique France (SpF), Direction des maladies infectieuses, au cas par cas :

- Dès la suspicion ou la confirmation d'un cas de choléra ; des contacts sont alors immédiatement établis entre le CNR et SpF,
- En cas d'événement inhabituel, augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques, isolement d'un nouvel agent ou modification des voies de contamination, pour les infections à VNC. Depuis 1995, le CNRVC a mis en place un système de surveillance des infections françaises à VNC par le biais d'une fiche de recueil de renseignements cliniques et épidémiologiques permettant de suivre l'évolution du nombre et des formes cliniques des infections, l'exposition du patient, l'existence d'un terrain prédisposant. Cette fiche d'accompagnement est accessible en ligne sur le site internet du CNR, <https://www.pasteur.fr/fr/file/3052/download>.

Les données du CNRVC concernant les infections à VNC sont communiquées à SpF annuellement, par le biais du rapport d'activité, ou sur demande à l'occasion d'enquêtes ponctuelles.

Le CNRVC peut être amené à communiquer également avec l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) site de Boulogne-sur-Mer qui est Laboratoire National de Référence (LNR) *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche, et l'IFREMER, à l'occasion d'enquêtes ponctuelles.

De même, le CNRVC contribue aux réseaux de surveillance internationaux européens ECDC et EFSA, s'il est sollicité pour le faire, généralement pour l'envoi de données de surveillance.

Il a été noté par l'ANSES, lors d'un travail au niveau européen avec l'EFSA sur les *Vibrio* dans les produits aquatiques et notamment les coquillages, que la France disposait des meilleures données sur les infections cliniques à *V. parahaemolyticus* en Europe.

Le CNRVC est un interlocuteur privilégié de l'OMS sur la thématique choléra. L'Institut Pasteur est membre de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS et le CNRVC est régulièrement sollicité pour une aide au diagnostic et la confirmation d'épidémies sur le plan international.

Suite à une demande de l'OMS, le CNRVC a centralisé les données de séquences (ou le séquençage) des souches de choléra des différents pays européens ayant déclaré des cas de choléra à l'ECDC ou à l'OMS en 2022. Cette initiative de surveillance génomique européenne des cas de choléra importés est en cours de reconduction pour l'année 2023. Cette surveillance européenne a permis d'avoir connaissance dès la fin de 2023 de la diffusion de la souche hautement résistance aux antibiotiques avant qu'elle n'arrive aux Comores et à Mayotte.

Le CNRVC propose régulièrement son aide pour l'analyse des différentes souches de choléra isolées dans les différents pays européens et autres continents grâce à son expertise dans le domaine.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Etude des types de PCR syndromique utilisés pour le diagnostic des gastro-entérites en France en 2024

Objectif de l'enquête : Déterminer les panels syndromiques utilisés pour le diagnostic des gastro-entérites en France par les laboratoires.

Partenaires : Le type de PCR syndromique utilisée est demandée sur la feuille de renseignement lors de l'envoi d'un échantillon au CNRVC par les laboratoires correspondants.

Principaux résultats :

Tableau 10. Caractéristiques des différents panels de qPCR syndromiques commerciales utilisés par les laboratoires envoyant leurs souches ou prélèvements au CNRVC.

Seegene Allplex™ GI-Bacteria(I) assay (Eurobio)	BioFire FilmArray gastrointestinal (GI) panel (bioMérieux)	Diag CORE Gastrointestinal Panel (Qiasat DX Qiagen)	BD MAX Extended Enteric Bacterial Panel (xEBP)
Rendu <i>Vibrio</i> sp. (Recherche de <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>)	Recherche <i>Vibrio</i> sp. et <i>V. cholerae</i>	Recherche et rendu des 3 cibles séparément <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	Recherche <i>Vibrio</i> sp. (<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>)
Trois cibles pour <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> et <i>V. vulnificus</i>	Cible <i>gyrB</i> pour <i>Vibrio</i> sp. et <i>toxR</i> pour <i>V. cholerae</i>	Cibles spécifiques de chaque espèce inconnues	Cible inconnue

Résultats :

Panel utilisé	Nombre d'échantillons
Allplex	113
BDMax	11
FilmArray	14
Non précisé	43
Diag CORE	164 (Mayotte)
Total général	345

4. Alertes

Procédures d'alertes de Santé publique France et de la Direction générale de la santé

• **Le choléra est une maladie à déclaration obligatoire** en France. Cette déclaration doit permettre au médecin inspecteur de santé publique de réagir rapidement pour mettre en place les mesures de prévention individuelle et collective autour des cas, et de déclencher des investigations pour identifier l'origine de la contamination et agir pour la réduire. Ces investigations peuvent impliquer les Cellules interrégionales d'épidémiologie (Cire), SpF et le CNRVC.

- Les médecins et les biologistes qui suspectent un diagnostic de choléra (cas probable d'après la clinique et le contexte épidémiologique) doivent en informer le médecin inspecteur de santé publique de l'ARS de leur lieu d'exercice (signalement) et les biologistes doivent envoyer la souche suspecte au CNRVC. Le signalement, procédure d'urgence et d'alerte, s'effectue sans délai et par tout moyen approprié (téléphone, télécopie). Il n'existe pas de support spécifiquement dédié au signalement, c'est généralement la fiche de Déclaration Obligatoire (DO) qui en fait effet, disponible sur le site internet du CNRVC ainsi que sur le site de SpF, https://www.formulaires.service-public.fr/gf/cerfa_12197_02.do. La notification intervient après le signalement et après confirmation du diagnostic par le CNRVC.

- L'isolement possible d'une souche de vibron cholérique peut être signalée au CNRVC soit directement par le microbiologiste ayant fait un diagnostic présomptif, soit par SpF (Direction des maladies infectieuses), agence elle-même alertée par l'intermédiaire des Agences Régionales de Santé (ARS). Dans tous les cas, dès la suspicion d'un cas de choléra, des contacts sont immédiatement établis entre le CNRVC et SpF. Les ARS sont responsables de l'enquête et du traçage des cas, en collaboration avec les équipes de cliniciens, éventuellement du CNRVC, et l'appui de SpF et des Cellules interrégionales d'épidémiologie (Cire) si nécessaire. La confirmation microbiologique d'un cas de choléra sur le territoire français est faite par le CNRVC, elle fait l'objet d'une déclaration par le CNRVC à SpF (Direction des maladies infectieuses) et à la Direction générale de la santé (DGS), Centre Opérationnel de Régulation et de Réponse aux Urgences Sanitaires et Sociales (CORRUSS), par fax et par courrier.

- Le ministère de la Santé et des Solidarités peut être amené à assurer la déclaration internationale des cas confirmés à l'OMS, si le cas entre dans les critères de déclaration du Règlement Sanitaire International en vigueur.

• Dans le cas des **infections à VNC**, le CNRVC informe systématiquement SpF, par mail ou par téléphone, en cas de phénomène anormal, dès lors qu'il peut constituer une urgence de santé publique (formes cliniques inhabituelles, souches atypiques, cas d'infections à *V. vulnificus*, ...).

Événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année 2024

• **Ving-six signalements** (dont le CNR a eu connaissance) ont été faits pour suspicion de cas de choléra en 2024 par des biologistes ou cliniciens aux ARS, qui ont elles-mêmes alerté SpF et le CNRVC (hors Mayotte). Les ARS concernées étaient :

- Auvergne-Rhône-Alpes
- Guadeloupe
- Hauts de France
- Île de France
- La Réunion
- Nouvelle Aquitaine
- Occitanie
- Pays de la Loire

- **Cinq cas de choléra importés en France métropolitaine de pays asiatiques ont été confirmés et ont fait l'objet d'un signalement** du CNRVC vers la DGS et SpF.

- Les résultats du CNRVC pour les souches ou prélèvements transmis lors de l'épidémie de choléra à Mayotte ont été transmis de façon groupée et régulière à la DGS et SpF.

- Les autres signalements n'ont pas été confirmés comme des cas de choléra sur la base des analyses microbiologiques des souches ou des prélèvements de selles reçus au CNRVC.

- Le CNRVC a été sollicité par l'ARS Pays de la Loire pour un avis concernant un cas d'infection à *V. vulnificus* survenu lors d'une pêche à pied. Le CNRVC s'était également entretenu avec IFREMER Nantes (LNR Coquillage pour les *Vibrio* sp) concernant ce cas.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Formations

Des enseignements sur le choléra et infections à VNC sont dispensés à l'attention de professionnels de santé, médecins, pharmaciens, vétérinaires, scientifiques et ingénieurs souhaitant se spécialiser dans les relations entre les agents infectieux, leurs hôtes et l'environnement.

- Diplôme Universitaire en Histoire de la médecine et des maladies, Faculté de médecine de Paris-Cité, « Histoire du choléra », visioconférence ([Marie-Laure Quilici](#), 1h30), 13 janvier 2024.
- Cours choléra, Staff clinique Infectiologie, Hôpital Ambroise Paré ([Caroline Rouard](#), 1h), 30 janvier 2024
- Cours de l'École Pasteurienne d'Infectiologie, « Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque », "Le choléra, épidémiologie et prévention », Institut Pasteur ([Marie-Laure Quilici](#), 2 h), 6 février 2024.
- Présentation orale « Epidémiologie internationale du choléra », Webinaire Choléra Mayotte, COREB ([Caroline Rouard](#), 20 min), 29 Mars 2024
- Cours sur les Vibrions non cholériques, Staff clinique Infectiologie, Hôpital Ambroise Paré ([Caroline Rouard](#), 1h), 15 mai 2024
- Présentation des activités de surveillance CNR Vibrions et Choléra aux épidémiologistes européens, GenEpiBioTrain Water-born diseases ECDC, Institut Pasteur ([Caroline Rouard](#), 15min), 30 mai 2024
- Cours Master 2, Université Paris, Sorbonne Université, Spécialité Microbiologie, option bactériologie moléculaire et médicale, Module épidémiologie. « Epidémiologie du choléra », Faculté de Médecine, Saint-Antoine et Sorbonne Université ([Caroline Rouard](#), 2h), 10 décembre 2024.
- Case study: Genomic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates from cholera cases, Europe 2022 and Mayotte 2024, Epidémiologistes bactériologistes et bioinformaticiens européens, GenEpiBioTrain Vaccine preventable diseases ECDC, Institut Pasteur ([Caroline Rouard](#), 2h), 9 décembre 2024

Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et productions du CNRVC

Après des partenaires

- SpF, DGS : les échanges de données de surveillance en interface avec SpF ont été décrits au point 3-4 de ce rapport. Les données de surveillance sont communiquées à SpF sur demande, à l'occasion d'enquêtes ponctuelles, et annuellement par le rapport d'activité du CNRVC.
- Après d'autorités partenaires telles que l'ANSES, l'IFREMER, le CNRVC communique régulièrement avec ces différentes instances, dans le cadre de programmes de recherche communs, ou à l'occasion d'enquêtes ponctuelles ou de sollicitations conjointes par les autorités partenaires (DGS ou DGAL).

Auprès des professionnels de santé et des laboratoires correspondants

Des échanges sont établis avec les microbiologistes et les cliniciens ayant envoyé une souche de vibron au CNRVC, soit à réception des échantillons soit à l'occasion de l'envoi des résultats. Le CNRVC réceptionne également des appels de correspondants pour des demandes de méthodes ou de réactifs de référence. Les informations demandées sont généralement transmises par mail. Un alias vibrions@pasteur.fr a été mis en place pour la réception des demandes. Le volume d'activité est extrêmement variable et fonction de l'actualité.

La diffusion d'informations est effectuée par l'envoi de documents de référence (articles généraux publiés dans l'EMC, la Presse Médicale, Spectra Biologie, case reports). Une fiche de recueil de données cliniques et épidémiologiques est systématiquement demandée, l'importance de ce recueil est soulignée, d'autant que c'est l'interrogatoire du patient ou de son entourage, effectué le plus souvent a posteriori, plutôt que l'observation des manifestations cliniques, qui permet généralement d'évoquer l'hypothèse d'une infection à VNC.

Les résultats de l'identification bactériologique et de la recherche des facteurs de pathogénicité sont communiqués aux microbiologistes et/ou cliniciens par un courrier personnalisé, les sensibilisant à l'intérêt de la recherche des vibrions dans les prélèvements biologiques. Le CNRVC est prêt à collaborer avec les médecins ou cliniciens souhaitant publier des « case reports ».

Les informations concernant le CNRVC (analyses réalisées, fiche de renseignements à compléter, condition d'envoi, de transport...) sont accessibles par le biais de pages Internet dédiées sur le site de l'Institut Pasteur : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/cnr/les-cnr/vibrions-cholera>

La dernière version du rapport du CNRVC est accessible en ligne sur ce site.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- Le CNRVC a été sollicité pour participer aux réunions du CORRUS (DGS) pour la validation d'un plan d'action pour « l'anticipation de l'introduction du choléra à Mayotte » avec des réunions hebdomadaires suite à l'épidémie de choléra aux Comores, de février à avril 2024.
- Le CNRVC a été sollicité en avril 2024 par la nomination d'un expert dans le groupe de travail mis en place par le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) suite à une saisine de la DGS dans le cadre des « Mesures d'anticipation et de gestion autour du choléra à Mayotte : Vaccination et gestion des corps dans un contexte de choléra à Mayotte » (Marie-Laure Quilici). <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=1376> (avis du 15 avril 2024)
- Le CNRVC a été sollicité en mars 2024 par la DGS pour une réunion autour d'une suspicion de cas de choléra à la Réunion. Ce cas a finalement été infirmé par le CNR.
- Le CNRVC a été sollicité en avril 2024 par la DGS (réunion DGS/ SpF/ ARS Guadeloupe) pour une suspicion de choléra en Guadeloupe, cas infirmé.
- Le CNRVC a participé à une réunion de concertation sur l'analyse des eaux à Mayotte dans le contexte du choléra en mai 2024 (ARS Mayotte, SpF, ANSES, Renaud Piarroux, Eau de Paris).
- Le CNRVC a poursuivi ses activités en lien avec la GTFCC/OMS par la présidence du Groupe de travail « Laboratoire » (Marie-Laure Quilici) dont une partie des activités participe également au Groupe de travail « Surveillance », incluant laboratoire et épidémiologie. L'objectif est d'améliorer les méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra, participant à l'élaboration de stratégies de diagnostic dans un objectif global de surveillance des épidémies. Plusieurs notes et directives techniques sont publiées en anglais et français (portugais et arabe en cours) sur le site web de la GTFCC de l'OMS, <https://www.gtfcc.org/fr/>.

En 2024, le groupe de travail « Surveillance » de la GTFCC/OMS a publié le nouveau guide sur la **Surveillance de santé publique du choléra**, présentant les recommandations minimales à suivre par les pays pour mettre en place une surveillance du choléra adaptative et appropriée, <https://www.gtfcc.org/resources/public-health-surveillance-for-cholera/>

Pour faire suite aux recommandations de ce guide, ont également été finalisés en 2024 des profils de produit cible (Target Product Profile, TPP), qui décrivent les principales performances et caractéristiques opérationnelles qu'un produit doit posséder pour répondre aux besoins des utilisateurs et des programmes de santé publique. Ces TPP ont concerné les **Tests de diagnostic rapide** appliqués à la surveillance des épidémies de choléra, et des **Tests moléculaires** appliqués à la confirmation des cas et la caractérisation de l'agent pathogène. L'élaboration de ces TPP a été coordonnée par FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics), fondation suisse à but non lucratif, un membre du CNR a fait partie du groupe de travail.

o Target product profile for a rapid diagnostic test for surveillance of cholera outbreaks, février 2024, <https://www.gtfcc.org/resources/target-product-profile-for-a-rapid-diagnostic-test-for-surveillance-of-choleraoutbreaks/>

o Target product profile for a molecular test for surveillance of cholera, juin 2024, <https://www.gtfcc.org/resources/target-product-profile-for-a-molecular-test-for-surveillance-of-cholera/>

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

- Avril 2024 : Interview de Caroline Rouard pour un article du « Vidal Actualités » sur le choléra en lien avec l'épidémie de Mayotte
 - o <https://www.vidal.fr/actualites/30778-cholera-une-maladie-toujours-d-actualite.html#:~:text=L'Organisation%20mondiale%20de%20la,incidence%20est%20probablement%20sous%20Destim%C3%A9e.>
- Avril 2024 : Interview de François-Xavier Weill pour un article de BFMtv sur le choléra en lien avec l'épidémie de Mayotte
 - o https://www.bfmtv.com/sante/comment-expliquer-la-multiplication-des-cas-de-cholera-a-mayotte_AV-202404291021.html
- Avril 2024 : Interview de François-Xavier Weill dans Le Figaro sur le choléra lien avec l'épidémie de Mayotte
 - o <https://sante.lefigaro.fr/social/sante-publique/mayotte-sur-le-pied-de-guerre-pour-faire-face-au-cholera-20240429>
- Décembre 2024 : Communiqué de presse de l'Institut Pasteur sur la souche de vibron cholérique hautement résistante aux antibiotiques (lettre dans NEJM)
 - o <https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/du-yemen-mayotte-diffusion-souche-hautement-resistante-aux-antibiotiques-agent-du-cholera>
- Décembre 2024 : Interview de François-Xavier Weill par France Inter sur la souche de vibron cholérique hautement résistante aux antibiotiques (lettre dans NEJM)
 - o https://www.francetvinfo.fr/sante/maladie/une-souche-du-cholera-resistante-aux-antibiotiques-identifiee-a-mayotte-par-des-scientifiques-francais_6952679.html
- Décembre 2024 : Interview de François-Xavier Weill par TF1 sur la souche de vibron cholérique hautement résistante aux antibiotiques (lettre dans NEJM)
 - o <https://www.tf1info.fr/sante/cholera-yemen-mayotte-kenya-cette-souche-hautement-resistante-aux-antibiotiques-qui-se-diffuse-2339034.html>
- Décembre 2024 : Interview de François-Xavier Weill par Le Monde sur la souche de vibron cholérique hautement résistante aux antibiotiques (lettre dans NEJM)
 - o https://www.lemonde.fr/planete/article/2024/12/11/cholera-une-souche-tres-resistante-aux-antibiotiques-a-l-origine-des-epidemies-au-liban-et-a-mayotte_6443146_3244.html

- Décembre 2024 : Podcast France culture avec Caroline Rouard sur la souche de vibron cholérique hautement résistante aux antibiotiques (lettre dans NEJM)
 - <https://www.radiofrance.fr/franceculture/podcasts/avec-sciences/une-souche-de-cholera-resistante-aux-antibiotiques-identifiee-a-mayotte-1248248>
- Décembre 2024 : Interview de François-Xavier Weill dans Le Figaro sur le risque de résurgence du choléra à Mayotte suite au cyclone Chido
 - <https://sante.lefigaro.fr/quel-est-le-risque-d-un-retour-du-cholera-a-mayotte-apres-le-passage-du-cyclone-chido-20241217>
- Décembre 2024 : Interview de François-Xavier Weill dans Sciences et Avenir sur le risque de résurgence du choléra à Mayotte suite au cyclone Chido
 - https://www.sciencesetavenir.fr/sante/mayotte-une-souche-du-cholera-multiresistante-pourrait-elle-refaire-surface_183054

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

Choléra

En 2024, les activités de recherche se sont concentrées sur les isolats de vibron cholérique (128 souches) reçus dans le cadre de l'épidémie de choléra de Mayotte (avril à juillet 2024). Cette souche épidémique, qui appartenait à la sous-lignée AFR13 (Weill *et al.* Nature 2019), présentait la particularité d'être une souche hautement résistante aux antibiotiques. Elle restait cependant sensible à la doxycycline (l'antibiotique par voie orale recommandé en première intention dans le traitement du choléra ; la ciprofloxacine et l'azithromycine étant des alternatives). Cette souche présentait deux mutations chromosomiques dans les gènes *gyrA* (S83I) et *parC* (S85L) entraînant une résistance à la ciprofloxacine et avait acquis un plasmide de résistance IncC porteur, entre autres, de gènes de résistance à l'azithromycine (*mph(A)* et *mph(E)*) et d'un gène codant pour PER-7, une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Cette souche était phylogénétiquement reliée aux souches BLSE que nous avons précédemment identifiées au Yémen fin 2018 (Lassalle *et al.* Nature Microbiology 2023), au Liban en 2022 (Abou-Fayad *et al.* Nature Communications 2024) et chez trois voyageurs européens (France, Belgique et Royaume Uni) après contamination au Kenya en 2023. Ce travail a permis de documenter la diffusion de cette souche inquiétante de *V. cholerae* BLSE du Yémen à l'Afrique de l'Est. Il a été publié en décembre 2024 comme une correspondance dans le New England Journal of Medicine (Rouard *et al.*). Un communiqué de presse a été publié par l'Institut Pasteur (<https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/du-yemen-mayotte-diffusion-souche-hautement-resistante-aux-antibiotiques-agent-du-cholera>) et des interviews ont été données par François-Xavier Weill et Caroline Rouard.

Pour faire suite à l'étude de surveillance génomique des souches issues de cas de choléra importés en Europe en 2022 (Rouard *et al.* Euro Surveill 2024), une étude similaire a été initiée pour l'année 2023. A l'heure actuelle, la totalité des pays ayant reporté des cas à l'OMS ou à l'ECDC ou à leurs autorités nationales (Royaume Uni, Suède, Allemagne, Finlande) ont accepté de participer et nous ont soumis des souches ou des génomes. Une invitation a été également envoyée au CDC d'Atlanta pour pouvoir également étudier les souches isolées de cas importés aux Etats-Unis.

V. alginolyticus / *V. diabolicus*

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif halophiles dont l'habitat naturel est l'environnement marin. *V. alginolyticus* appartenant au groupe *V. harveyi* est l'une des principales espèces impliquées en pathologie humaine avec principalement deux formes cliniques : infections de plaies et otites, certains cas pouvant être associés à des bactériémies. La principale voie d'exposition est le contact direct avec l'eau de mer. Des cas de gastro-entérites ont parfois été associés à cette espèce, bien qu'elle ne soit pas considérée comme pathogène pour l'homme par voie alimentaire. L'espèce *V. diabolicus*, proche de *V. alginolyticus*, a été décrite pour la première fois en 1997, isolée comme pathogène chez des crustacés mais n'a encore jamais été décrite comme telle pour l'Homme. C'est l'analyse des génomes complets qui a permis dans une étude de 2018 de reclasser correctement les souches appartenant à l'espèce *V. alginolyticus* ou à l'espèce *V. diabolicus* puisque les techniques courantes de diagnostic ne permettent pas de les différencier. **L'objectif** de notre étude était donc de rechercher parmi les souches de *V. alginolyticus* isolées de cas cliniques en France si certaines souches appartenaient à l'espèce *V. diabolicus* et quelles étaient les caractéristiques bactériologiques, cliniques et

épidémiologiques associées.

Matériel et méthodes :

- 73 souches identifiées comme *V. alginolyticus* (72 cas cliniques)
 - Collectées au CNR Vibrions et choléra entre 1995 et 2024
 - Séquençage génome complet (Illumina)
- 29 séquences de souches du groupe *V. harveyi* et *V. fluvialis* récupérées dans des bases de données
- Analyses génomiques :
 - Blast (comparaison de séquence),
 - Resfinder (recherche des gènes de résistance acquis),
 - JSpeciesWS (détermination de l'ANI, Average Nucleotide Identity, entre les souches),
 - Kraken (assignation taxonomique sur des courtes séquences d'ADN)
 - rMLST (Ribosomal Multilocus Sequence Typing sur les 53 gènes codant les sous-unités protéiques du ribosome bactérien).
 - Phylogénie : Prokka, Roary pour le core génome (gènes présents chez 99% des souches), IQTREE, iTOL
- Analyses phénotypiques : 9 souches ont été repiquées sur milieu non sélectif GNA, milieux sélectifs TCBS et CHROMID Vibrio et analysées en spectrométrie de masse (MALDI TOF).
- Analyse des données cliniques et épidémiologiques

Résultats :

- *V. alginolyticus* et *V. diabolis* sont phénotypiquement identiques et non différenciables au MALDI-TOF
- Deux groupes phylogénétiques proches mais distincts ont été identifiés parmi les souches identifiées initialement comme *V. alginolyticus* au CNRVC
- JSpeciesWS :
 - 93% identité nucléotidique entre les espèces *V. alginolyticus* et *V. diabolis*
 - $\geq 98\%$ identité nucléotidique entre les souches d'une même espèce
- Distribution saisonnière : identique entre les 2 espèces, avec un pic en été
- Syndromes cliniques globalement similaires entre les deux espèces, mais à noter plus de gastro-entérites liées à l'espèce *V. diabolis* (les souches issues des dépistages ne sont pas prises en compte dans nos analyses)
- Infections à *V. diabolis* présentes depuis 1995 en France
 - Augmentation du recensement des cas avec le temps
 - À comparer avec l'augmentation des cas d'infection aux vibrions non cholériques et à l'amélioration des techniques de diagnostic
- Au moins 3 gènes spécifiques à l'espèce *V. diabolis*
- Gènes présents chez les 2 espèces mais avec un % d'identité nucléotidique différent
 - Gène de résistance aux β -lactamines *bla*_{CARB-42} : 100% d'identité chez *V. alginolyticus* et 90% d'identité chez *V. diabolis*
- Pas de cluster en fonction de l'origine géographique, l'année d'isolement ou de la porte d'entrée de l'infection.

Conclusion :

Nous décrivons pour la première fois l'espèce *V. diabolis* comme responsable d'infections chez l'Homme. *V. diabolis* possède le même spectre d'infection que *V. alginolyticus* avec cependant plus de tableaux de gastro-entérites. *V. diabolis* est présent en France métropolitaine sur les côtes méditerranéenne et atlantique, alors que cette espèce n'avait jamais été décrite en France. Les souches du CNR avaient été identifiées comme *V. alginolyticus* dans le passé car les deux espèces sont très proches comme le confirme notre arbre phylogénétique contenant beaucoup plus de souches que ce qui avait été publié précédemment. Nos résultats confirment que les deux espèces ne sont pas différenciables par le MALDI-TOF et sont phénotypiquement très proches, mais la distinction pourrait être faite à l'aide

d'une PCR spécifique de l'espèce *V. diabolicus*.

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

Nombre de publications internationales : 7

Nombre de publications mentionnant les financements de Santé publique France : 3

Publications internationales

Jalalizadeh F, Njamkepo E, Weill FX, Goodarzi F, Rahnamaye-Farzami M, Sabourian R, Bakhshi B. Genetic approach toward linkage of Iran 2012-2016 cholera outbreaks with 7th pandemic *Vibrio cholerae*. BMC Microbiol. 2024 Jan;22;24(1):33. doi: 10.1186/s12866-024-03185-9.

Mazzilli S, Youssouf H, Durand J, Soler M, Cholin T, Herry F, Collet L, Jean M, Ransay-Colle M, Benoit-Cattin T, Rouard C, Figoni J, Noël H, Piarroux R, Lapostolle A. Outbreak of *Vibrio cholerae*, Mayotte, France, April to July 2024. Euro Surveill. 2024 Aug;29(35):2400518. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.35.2400518.

Abou Fayad A*, Rafei R*, Njamkepo E*, Ezzeddine J, Hussein H, Sinno S, Gerges JR, Barada S, Sleiman A, Assi M, Baaklany M, Hamedeh L, Mahfouz R, Dabboussi F, Feghali R, Mohsen Z, Rady A, Ghosn N, Abiad F, Abubakar A, Barakat A, Wauquier N, Quilici ML, Hamze M*, Weill FX*, Matar GM*. An unusual two-strain cholera outbreak in Lebanon, 2022-2023: a genomic epidemiology study. Nat Commun. 2024 Aug 13;15(1):6963. doi: 10.1038/s41467-024-51428-0.
*Contribution équivalente

Rouard C, Njamkepo E, Quilici ML, Nguyen S, Knight-Connoni V, Šafránková R, Weill FX. *Vibrio cholerae* serogroup O5 was responsible for the outbreak of gastroenteritis in Czechoslovakia in 1965. Microb Genom. 2024 Sep;10(9):001282. doi: 10.1099/mgen.0.001282.

Rouard C, Greig DR, Tauhid T, Dupke S, Njamkepo E, Amato E, van der Putten B, Naseer U, Blaschitz M, Mandilara GD, Cohen Stuart J, Indra A, Noël H, Sideroglou T, Heger F, van den Beld M, Wester AL, Quilici ML, Scholz HC, Fröding I, Jenkins C, Weill FX. Genomic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates from cholera cases, Europe, 2022. Euro Surveill. 2024 Sep;29(36):2400069. doi:10.2807/1560-7917.ES.2024.29.36.2400069.

Rafei R, Osman M, Kassem II, Dabboussi F, Weill FX, Hamze M. Spotlight on the epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of *Vibrio* species in the MENA region, 2000-2023. Future Microbiol. 2024;19(15):1333-1353. doi: 10.1080/17460913.2024.2392460.

Rouard C, Collet L, Njamkepo E, Jenkins C, Sacheli R, Benoit-Cattin T, Figoni J, Weill FX. Long-Distance Spread of a Highly Drug-Resistant Epidemic Cholera Strain. N Engl J Med. 2024 Dec 12;391(23):2271-2273. doi: 10.1056/NEJMc2408761.

Communications nationales

François-Xavier Weill. Conférence sur invitation « Le choléra une maladie d'actualité en 2024 » : 25^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie, Deauville, 12-14 juin 2024.

François-Xavier Weill. Conférence sur invitation « Le choléra une maladie hydrique toujours d'actualité en 2024 ». Colloque Humanimal, Maisons-Alfort, 17-18 octobre 2024.

Caroline Rouard Conférence sur invitation « Le choléra du point de vue du CNR ». Colloque Mayotte en santé, 10 septembre 2024

Caroline Rouard. Présentation orale « Origine et évolution de la souche de choléra, Mayotte 2024 ». 44^{ème} RICAI, Paris, 16-17 décembre 2024.

Communications internationales

François-Xavier Weill. Présentation sur invitation « Contribution of microbial genomics to cholera epidemiology », Translational day, Institut Pasteur, Paris, 19 novembre 2024.

François-Xavier Weill. Présentation sur invitation « Contribution of microbial genomics to cholera health emergencies ». WHO EPI WIN IPSN webinar series 'Pathogen Genomics in Health Emergencies'. 12 décembre 2024 (800 participants).

Marie-Laure Quilici. Présentation « Achievements, challenges and identified priorities of the Laboratory Working Group ». 11th Annual Meeting of the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC), 19-21 juin 2024, Veyrier-du-Lac, France.

Marie-Laure Quilici. Présentation « Achievements of the GTFCC Laboratory Working Group ». 9th surveillance meeting of the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC), 21-23 mai 2024, Le Caire, Egypte.

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

- Dans le domaine de la santé alimentaire, le CNRVC collabore principalement, et depuis de nombreuses années, avec le Laboratoire d'Études et de Recherche sur les Produits de la Pêche de l'ANSES à Boulogne-sur-Mer, désigné en 2011 LNR *Vibrio* dans les Produits de la Pêche. En 2024, le CNRVC et le LNR effectué un échange inter-laboratoire portant sur 6 souches envoyées par le LNR au CNR. Le CNRVC et le LNR sont également en contact pour la mise en place de différentes qPCR de diagnostic.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Activités d'expertise

- Développement d'outils bioinformatiques pour assurer la transition entre bactériologie classique et génomique haut-débit pour l'identification et le typage des VNC. Le premier outil permettra le sérogroupage *in silico* des souches de *V. cholerae*.
- Validation de méthode de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des souches de *Vibrio* sp.
- Poursuite du développement de méthodes de qPCR pour remplacer les PCR conventionnelles utilisées en routine au CNRVC pour le diagnostic, avec réalisation de dossiers de validation de méthode :
 - o *V. cholerae* : identification d'espèce, recherche gène *ctxA*, gène *rfbO1*, gène *rfbO139*,
 - o *V. parahaemolyticus* : identification d'espèce
- Réalisation d'une enquête sur les modalités de réalisation des PCR syndromiques auprès des correspondants du CNRVC – organisation d'un réseau.
- Etude de la sensibilité / spécificité de la PCR syndromique Allplex sur différentes espèces de *Vibrio* sp.

Recherche

- Poursuite des analyses phylogénomiques des souches récentes de vibrions cholériques de la septième pandémie pour mieux comprendre la circulation mondiale et l'évolution génétique de cet agent pathogène.
- Poursuite de l'étude génomique d'une collection historique de 250 souches du vibron cholérique de biotype classique pour mieux comprendre la structure des populations et l'évolution de ce pathogène historique qui a disparu au profit du biotype El Tor au cours des années 1970 et 1980.
- Poursuite de l'étude génomique d'une collection de 250 souches représentatives de *V. cholerae* non-O1/non-O139 pour mieux décrire les populations pathogènes de ce groupe bactérien peu connu quant à sa diversité génétique et sa pathogénèse.
- Réalisation de CMI pour les souches de *V. cholerae* El Tor de la 7^{ème} pandémie pour les différentes familles d'antibiotiques.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Vibrions et choléra

Le CNR Vibrions et choléra s'engage à assurer les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté de mars 2022 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles.

Il sera en outre particulièrement demandé à ce CNR les missions suivantes :

Pour le *Vibrio cholerae*

1. Expertise

- en confirmant l'identification et en typant les souches de vibron cholérique ;
- en caractérisant la toxine CT des *V. cholerae* ;
- en étudiant et en suivant la résistance aux antibiotiques ;
- en collaborant, notamment par l'échange de souches, avec le CNR Résistance aux antibiotiques à l'étude des nouveaux mécanismes de résistance.

2. Conseil

- pas d'exigences particulières par rapport au cahier des charges général.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique

- en s'appuyant sur un réseau de laboratoires et en recensant les cas diagnostiqués, leurs principales caractéristiques et l'origine des cas importés ;
- en contribuant à la détection et à l'investigation des cas groupés ;
- en collaborant avec les réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE et les organismes compétents en santé humaine et dans le domaine de la sécurité alimentaire.

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout cas diagnostiqué en France Métropolitaine, dans les DOM, toute augmentation inhabituelle de cas, l'apparition de cas groupés, toute modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), toute modification des profils de résistance et l'apparition de souches inhabituelles, etc.

Pour les vibrions non cholériques

1. Expertise

- en apportant une expertise aux laboratoires de biologie médicale pour l'identification et le typage des souches de Vibrions (espèces peu courantes, rarement isolées par ces laboratoires) ;
- en diffusant les informations et techniques visant à identifier les vibrions halophiles dans un contexte de toxi-infection alimentaire d'origine halieutique ou marine.

2. Conseil

- pas d'exigences particulières par rapport au cahier des charges général.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique

- en développant un réseau de laboratoires et en recensant les cas diagnostiqués en France et leurs principales caractéristiques ;
- en contribuant aux réseaux de surveillance internationaux ;
- en participant à l'investigation d'épisodes de cas groupés (typage de souches, comparaison de souches isolées chez les malades et dans d'autres sources) ou d'autres événements inhabituels ;
- en collaborant avec les acteurs de la sécurité alimentaire (Ministère de l'Agriculture et de la pêche, Anses, DGCCRF, etc.) et avec les laboratoires spécialisés en hygiène alimentaire ou microbiologie environnementale.

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas ; apparition de cas groupés ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles) ; apparition de souches inhabituelles ; etc.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Nom - Prénom	Fonction / Statut / Qualification	Organisme payeur	ETP
François-Xavier WEILL	Responsable CNRVC / Professeur Institut Pasteur / Biologiste médical	Institut Pasteur	0,2
Caroline ROUARD	Responsable adjoint CNRVC / Cadre médicale Biologie / Biologiste médical	Institut Pasteur	0,4
Jean-Gabriel LESDEMA	Technicien supérieur de recherche	Institut Pasteur	0,35
Marie ACCOU-DEMARTIN	Technicienne supérieure de recherche	Institut Pasteur	0,30
Corinne RUCKLY	Technicienne supérieure de recherche (remplaçante)	Institut Pasteur	0,1
Lynda MINGHELLI	Technicienne supérieure administrative	Institut Pasteur	0,25
TOTAL			1,6

1.3 Locaux et équipements

Surface des locaux et plan

Le CNRVC se situe dans l'Unité des Bactéries pathogènes entériques à l'Institut Pasteur, dont les locaux sont formalisés en rouge sur le plan ci-dessous. Cette unité est localisée dans le bâtiment BioTop du campus du 28 du Dr Roux, Paris 15.

Les locaux se trouvent principalement au 3^e étage de ce bâtiment :

- les pièces 01A et 02, représentant deux laboratoires pour une surface totale de 26 m², sont plus spécifiquement dédiées aux activités de bactériologie (pièce 01A : laboratoire P2) et de biologie moléculaire du CNRVC (pièce 02) ; un de ces deux laboratoires (pièce 01A), dont l'accès est limité au personnel du CNRVC, est également la pièce d'archivage des dossiers,
 - le secrétariat (pièces 03/04) est commun à l'UBPE, pour effectuer la saisie informatique des renseignements épidémiologiques accompagnant les souches, l'envoi et l'archivage des résultats,
 - la pièce 11 est un bureau commun pour le personnel permanent du CNRVC, ainsi que pour les stagiaires,
 - la pièce 01B est un bureau pour le responsable du CNRVC,
 - des locaux techniques sont partagés entre l'Unité des Bactéries pathogènes entériques et l'Unité des Spirochètes :
- * une pièce climatisée de 16,1 m² (n°10) pour les migrations par électrophorèse en agarose, les thermocycleurs, l'appareil d'acquisition d'image de gels et pour réaliser les extractions semi-automatiques d'ADN,

- 44

Principaux équipements

Dans la structure

Spécifiques au CNRVC :

- équipement courant d'un laboratoire de bactériologie : une enceinte climatique (35°C), un poste de sécurité microbiologique de classe II, un microscope, deux bains-marie,
- deux congélateurs à -80°C, trois containers à azote liquide, deux armoires de souches lyophilisées,
- équipement de biologie moléculaire : trois appareils à PCR, une centrifugeuse de paillasse réfrigérée, un évaporateur concentrateur SpeedVac ADN, des générateurs et des cuves à électrophorèse, deux Biophotomètres Eppendorf,
- une hotte chimique,
- une hotte pour PCR,

Commun à l'Unité BPE :

- un appareil PCR temps réel CFX96 (Bio-Rad),
- un système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes Sirscan,
- un système de lecture et d'interprétation des CMI en microdilution sur plaques Sensititre,
- un séquenceur MinION Mk1C, un séquenceur MinION Mk1D (Oxford Nanopore Technologies) pour effectuer du séquençage « long-read ».
- un extracteur d'ADN Maxwell RSC

Partagé avec d'autres entités :

- un système d'imagerie numérique (appareil d'acquisition d'image de gels Geldoc),
- deux agitateurs Infors, deux congélateurs à -80°C, une ultracentrifugeuse Beckman,
- un congélateur à -80°C de secours pour l'ensemble du bâtiment BioTop.

Moyens extérieurs à la structure et services supports

L'organisation générale et les moyens supports mis à disposition des unités hébergeant un CNR à l'Institut Pasteur sont décrits dans l'Annexe C, « Organisation des CNR à l'Institut Pasteur », et concernent en particulier :

- la Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) qui effectue les séquençages de génomes bactériens en temps réel dans le cadre des activités de Santé Publique (extracteur automatique d'ADN et séquenceur à haut débit NextSeq 500 d'Illumina),
- la Cellule d'intervention biologique d'urgence (CIBU)

Viennent également en support aux CNRVC :

- la Plateforme Milieux, qui réalise la fabrication des milieux, tampons et solutions simples et complexes en intégrant les normes ISO 9001 pour le management de la qualité et ISO 11133 pour la qualité des milieux de culture,
- la Plateforme OMICS qui permettra le séquençage des génomes bactériens pour les activités de recherche (séquenceurs à haut débit MiSeq et HiSeq2500 d'Illumina),
- le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRBIP) qui est équipé d'un appareil de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) Sirius (Bruker),
- le Centre de Bioinformatique, Biostatistique et Biologie intégrative (C3BI) qui sera impliqué dans les analyses bioinformatiques et le développement d'interfaces web,
- l'Animalerie centrale,
- le Service informatique pour les infrastructures informatiques,
- la Médiathèque scientifique avec la grande majorité des revues de microbiologie accessibles en ligne,
- le Service de Coordination des CNR et des CCOMS, chargé de coordonner les activités des Centres Nationaux de Référence et des Centres Collaborateurs de l'OMS placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur.

Les CNR de l'UBPE bénéficient également de l'assistance :

- d'Epiconcept pour le bon fonctionnement et l'amélioration du logiciel « Lagon » utilisé au CNRVC pour enregistrer les analyses,
- de la Société Eurofins (Cochin, Paris), prestataire de service pour des séquençages de type Sanger
- de la société Novogene pour le séquençage Illumina et de la société Plasmidsaurus pour le séquençage Nanopore

1.4 Collections de matériel biologique

=> Renseigner pour l'année 2024 l'annexe 4

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNRVC fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui étaient au nombre de 14 en 2024. 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.

La démarche qualité du CNRVC est présentée dans le point 1. Missions et Organisation du CNR. En termes d'activité des techniques accréditées, le nombre d'analyses effectuées est présenté ci-dessous :

CNR	Famille	Sous famille	Activités de biologie médicale	Nb analyses 2024	Accrédité (A) / non accrédité (NA)
Vibrions et choléra	Microbiologie	Bactériologie	Identification moléculaire de <i>V. parahaemolyticus</i>	122	A
			Identification moléculaire de <i>V. alginolyticus</i>	39	A
			Identification moléculaire de <i>V. vulnificus</i>	16	A
			Agglutination sur lame <i>V. cholerae</i>	184	A
			Détection des gènes <i>ctxA</i> codant la toxine cholérique	87	A
			Identification moléculaire de <i>V. cholerae</i>	68	A
			Identification souche de <i>Vibrio</i> sp	310	NA
			Identification de <i>V. cholerae</i> par PCR temps réel	64	NA
			Recherche du sérotype O1 par PCR temps réel	56	NA
			Recherche du gène <i>ctxA</i> par PCR temps réel	56	NA
			Antibiogrammes	248	NA

En 2024, le CNRVC a participé à deux échanges interlaboratoires (EIL) :

- L'un organisé par le Centre national de référence de Belgique pour *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* (CHU de Liège), par l'analyse de cinq souches de *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. fluvialis*). Les analyses portaient sur l'identification des espèces, la détection des gènes de virulence, ainsi que la détermination des sérogroupes O1/O139 et sérotypes Inaba/Ogawa pour *V. cholerae*. Les résultats étaient 100% conformes aux résultats attendus.
- L'autre organisé entre le CNRVC et le LNR *Vibrio* de Boulogne-sur-Mer. Six souches de *Vibrio* sp. (3 *V. cholerae*, 1 *V. vulnificus*, 2 *V. parahaemolyticus*) ont été envoyés par LNR au CNRVC. Les analyses portaient sur l'identification des espèces, la détection des gènes de virulence, ainsi que la détermination des sérogroupes O1/O139 et sérotypes Inaba/Ogawa pour *V. cholerae*. Les résultats étaient 100% conformes aux résultats attendus.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Liste des techniques de référence du CNRVC		Technique accréditée
Recherche des vibrions à partir de prélèvements par des techniques d'enrichissement en eau peptonée alcaline et isolement sur milieu sélectif (TCBS et GNA)		
Identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI TOF (Sirius Bruker) avec utilisation de la base de données Bruker ainsi que d'une base de données spécifique développée au CNRVC pour l'identification des espèces de <i>Vibrio spp</i> pathogènes pour l'homme		
Identification bactérienne par autres techniques de bactériologie classiques des différentes espèces de <i>Vibrio spp</i> pathogènes pour l'homme (Oxydase, Galerie API 20E, Cultures en concentrations croissantes de NaCl)		
Séro-agglutination des souches de <i>V. cholerae</i> pour recherche des sérogroupes O1 et O139		Oui
Séro-agglutination des souches de <i>V. cholerae</i> pour recherche des sérotypes Inaba et Ogawa		
Identification de <i>V. parahaemolyticus</i> (recherche du gène <i>r72H</i>) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. cholerae</i> (recherche de l'espace intergénique 16-23S) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. vulnificus</i> (recherche du gène <i>hly</i>) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. alginolyticus</i> (recherche du gène de la collagénase) par PCR en point final		Oui
Recherche des gènes <i>ctxA</i> et <i>ctxB</i> codant pour la toxine cholérique par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. cholerae</i> par PCR en temps réel		
Recherche du gène <i>ctxA</i> par PCR en temps réel		
Recherche du sérotype O1 par PCR en temps réel		
Identification bactérienne par séquençage Sanger de l'ARNr16S et du gène <i>rpoB</i>		
Séquençage complet des génomes (WGS) : short reads (Illumina), long reads (Minion)		
Caractérisation moléculaire de <i>V. cholerae</i>	Recherche et typage des gènes <i>hlyA</i> (hémolysine), <i>tcpA</i> (Toxin-corregulated pilus), <i>rstR</i> (Répresseur du phage CTX)	
	Recherche du gène <i>ctxA</i> (codant pour la cholix-toxine)	
	Recherche du gène <i>stn</i> codant pour une entérotoxine thermo-stable	
	Recherche des gènes <i>rfbO1</i> et <i>rfbO139</i> (codant les sérogroupes O1 et O139)	
	Recherche des gènes <i>ToxR</i> et <i>OmpW</i> (identification espèce <i>V. cholerae</i>)	
	MLST <i>in silico</i>	
Caractérisation moléculaire de <i>V. parahaemolyticus</i>	Recherche des gènes codant pour les hémolysines <i>tdh</i> et <i>trh</i>	
	Recherche des gènes correspondant aux clones pandémiques (<i>orf8</i> , <i>toxRS</i>)	
	Recherche du gène <i>toxR</i> (identification espèce <i>V. parahaemolyticus</i>)	
	MLST <i>in silico</i>	
	Recherche des gènes codant pour le T3SS1 (<i>vcrD1</i> , <i>VP1680</i> , <i>vopD</i>)	
	Recherche des gènes codant pour le T3SS2 (<i>vcrD2</i> , <i>vopD2</i> , <i>vopB2</i> , <i>vopP</i> , <i>vopC</i> , <i>vopT</i>)	

Mesure du titre d'anticorps vibriocides de sérums vis à vis des vibrions cholériques.	
Elution et PCR sur échantillons déposés sur papiers filtres secs (selles ou enrichissement), pour la confirmation de la présence de vibrions cholériques.	
Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux : <ul style="list-style-type: none"> - Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé - Détermination de la CMI en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™ - Détermination de la CMI en bandelettes Etest® - Interprétation de la sensibilité avec les critères CASFM-EUCAST 2024 <i>Vibrio spp</i>, CASFM-EUCAST 2024 Entérobactérales ou CLSI M45 (2015) en fonction des molécules - Recherche de gènes de résistance acquis sur génome (Resfinder) et recherche de mutations chromosomiques (résistance aux fluoroquinolones : <i>gyrA</i>, <i>gyrB</i>, <i>parC</i>, <i>parE</i> ; résistance aux nitrofuranes : VC0175, VCA0637 ; réversion de la sensibilité à la colistine) 	

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Liste des techniques recommandées par le CNRVC
<p>Recommandations pour la recherche des bactéries du genre <i>Vibrio</i> sp à partir des selles :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enrichissement des selles à l'aide d'eau peptonée alcaline - Culture sur milieux spécifiques et sélectifs : TCBS et GNA <p>Cependant de nombreux laboratoire ne disposent pas de ces différents milieux :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sur la base des retours d'expérience fait par les biologistes au CNRVC, la détection des espèces de <i>Vibrio</i> spp peut se faire sur des milieux habituellement utilisés pour la mise en œuvre d'une coproculture standard, éventuellement sans étape d'enrichissement préalable. <i>V. cholerae</i> en particulier est une bactérie peu exigeante pour sa culture, qui peut être isolée à partir d'une coproculture standard si elle est présente en grande quantité dans les selles. Le facteur limitant en l'absence d'une étape d'enrichissement cependant pourrait être la charge de l'inoculum initial, en particulier dans des cas peu symptomatiques. Les <i>Vibrio</i> spp poussent également très bien sur géloses au sang. - Quilici ML, Robert-Pillot A. Spectra Biologie n°215, mai 2015 <p>Références pour le diagnostic du choléra :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Quilici M.-L. (2011). Le diagnostic bactériologique du choléra. Revue Francophone des Laboratoires (Elsevier Masson SAS), Dossier Les Maladies Tropicales, 431, 51-65. - WHO/CDS/CSR/EDC/99/8/EN, Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera, Atlanta, GA: CDC. 1999. accessible en ligne à l'adresse suivante : http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera_lab_manual.htm. - WHO/CDS/CSR/EDC/99.8, Méthodes de Laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra », Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 2002 http://www.who.int/topics/cholera/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_99_8_FR/en/index.html <p>Référence pour le diagnostic des vibrions non cholériques (VNC) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Quilici M.-L, Robert-Pillot A. (2011). Infections à vibrions non-cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-026-F-15, 2011, 12 p.
<p>Utilisation des PCR multiplex / syndromiques pour la recherche des <i>Vibrio</i> dans les selles :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le CNRVC recommande d'être attentif aux gènes cibles de la PCR et à l'interprétation d'un signal positif. Ainsi une PCR ciblant les gènes de la toxine cholérique ne peut prétendre détecter l'ensemble des souches de l'espèce <i>V. cholerae</i>. - Le CNRVC rappelle la nécessité de confirmer par culture des résultats positifs par PCR multiplex syndromiques. Il recommande également de vérifier la cohérence d'un signal positif avec les données cliniques et épidémiologiques du cas.
<p>Identification des bactéries du genre <i>Vibrio</i> sp :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Spectrométrie de masse MALDI-TOF <ul style="list-style-type: none"> o ATTENTION à la base de données utilisée avec le système Bruker : l'identification de l'espèce <i>Vibrio cholerae</i> n'est possible que si l'extension (MNT IVD Library extension) a été ajoutée. Dans le cas contraire, une souche de <i>V. cholerae</i> sera identifiée <i>Vibrio albensis</i> ou <i>Vibrio mimicus</i> (avec un score entre 1.8 et 2). - Identification moléculaire : cible spécifique pour les différentes espèces ou séquençage de l'ARNr16S et gène <i>rpoB</i>
<p>Typage :</p> <ul style="list-style-type: none"> - L'analyse phylogénétique basée sur le WGS et l'analyse comparative des génomes sont utilisées pour étudier la structure de la population et l'évolution des <i>V. cholerae</i> O1 El Tor de la 7^{ème} pandémie
<p>Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :</p> <ul style="list-style-type: none"> - AntibioGramme par diffusion en milieu gélosé - Détermination des CMI - Interprétation de la sensibilité avec les critères CASFM-EUCAST 2024 <i>Vibrio</i> spp