

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2025

CNR Bactéries anaérobies et botulisme



	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Coordonnateur	Institut Pasteur	Christelle Mazuet puis Laure Diancourt (responsable par intérim en 2025). Marlène Amara depuis janvier 2026
Laboratoire Associé	Saint Antoine, APHP	Frédéric Barbut

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
1. Missions et organisation du CNR	6
Organigramme CNR	6
Mission et Organisation	7
Démarche Qualité	7
2. Activités d'expertise	9
2.1 Evolution des techniques	9
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	10
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2.4 Collections de matériel biologique	10
2.5 Activités d'expertises	11
2.6 Activités de séquençage	13
3. Activités de surveillance	17
3.1 Description du réseau de partenaires	17
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	21
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	27
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	31
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	32
4. Alertes	34
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	37
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	37
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	38
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	38
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	39
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	39
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	44
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	49
8. Programme d'activité pour les années suivantes	52

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	56
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	56
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	56
1.3 Locaux et équipements	57
1.4 Collections de matériel biologique.....	59
1.5 Démarche qualité du laboratoire	60
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	62
2.1 Liste des techniques de référence.....	62
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	63
Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	64
Annexe 4 : Recensement des collections de matériels biologiques (non destinées à être rendues publiques)	65

Résumé analytique

Faits marquants

Le CNR Bactéries anaérobies et Botulisme, sur le site de l'Institut Pasteur et sur le site de l'Hôpital Saint Antoine avec le laboratoire associé *Clostridioides difficile*, intervient dans la veille microbiologique, le soutien aux autorités sanitaires et aux missions de conseil et d'expertise sur plusieurs versants : le diagnostic des cas de botulisme humain et animal, la surveillance des infections à *C. difficile* (principal entéropathogène responsable de diarrhées associées aux soins), l'identification et typage de *C. difficile*, *C. botulinum* et des autres bactéries anaérobies impliquées en pathologie humaine en termes de virulence et de résistance. Le CNR et son laboratoire associé contribuent également à la surveillance et à l'alerte des infections nosocomiales (*C. difficile*) et des cas groupés d'infections.

Botulisme – activité d'expertise

- 767 prélèvements analysés : 503 humains, 225 alimentaires, 9 environnementaux, 30 vétérinaires.
- Détection de 11 foyers de botulisme alimentaire en France dont 1 foyer complexe -tortillas fabriquées en Espagne- avec de nombreux produits industriels rappelés ; 2 foyers à l'étranger ; 1 foyer animal ; 2 cas iatrogènes ; aucun cas infantile.

Clostridioides difficile – activité d'expertise

- 726 prélèvements analysés (humains, animaux, environnementaux, alimentaires).
- 483 isolats humains toxigènes.
- Principaux ribotypes : 106 (9 %), 002/2 (7 %), 014 (6 %), 0,4 % du PCR-ribotype 027.
- Finalisation d'une ANR portant sur le risque de contamination des filières bovine, porcine et avicole aux abattoirs et participation au projet européen Orchidée.

Bactéries anaérobies – autres expertises

- 141 souches humaines traitées : 135 isolats, 6 prélèvements pour recherche de pathogènes spécifiques.
- 1 diagnostic de TIAC à *C. perfringens*

Résultats clés

- Rôle clé dans la gestion des foyers de botulisme en lien direct avec les autorités sanitaires. 13 foyers alimentaires en 2025 contre 8 en 2024.
- Surveillance renforcée de *C. difficile* avec identification régulière des ribotypes à risque et suivi de leur évolution.
- Contribution directe aux alertes (nosocomiales, alimentaires,...) et aux recommandations de prise en charge grâce aux données de typage et de résistance.
- Surveillance des facteurs de virulence et résistances aux antibiotiques d'un panel large d'espèces bactériennes anaérobies.

Executive summary

Highlights

The National Reference Center (CNR) for Anaerobic Bacteria and Botulism, operating at the Pasteur Institute and Hôpital Saint-Antoine alongside its Associated Laboratory for *Clostridioides difficile*, provides microbiological surveillance and expert support to health authorities. It diagnoses human and animal botulism, monitors healthcare-associated *C. difficile* infections - the leading cause of antibiotic-associated diarrhea- and identifies and types *C. difficile*, *C. botulinum* and other pathogenic anaerobes for virulence and resistance. The CNR also tracks nosocomial and food-related outbreaks.

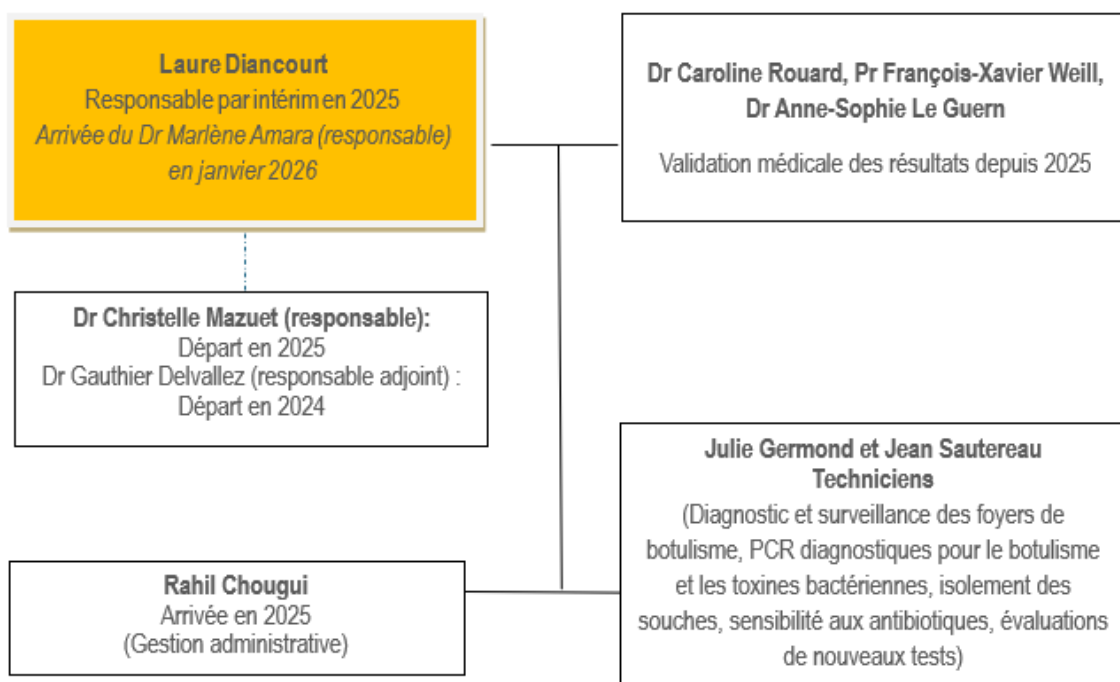
- Botulism expertise: 767 samples analyzed (503 human, 225 food, 9 environmental, 30 veterinary). Eleven foodborne outbreaks detected in France, including one complex case involving Spanish-manufactured tortillas triggering nationwide and international industrial recalls, 2 international outbreaks, 1 animal case, 2 iatrogenic cases, and no infant botulism.
- *C. difficile* expertise: 726 specimens processed (human, animal, environmental, food), yielding 483 toxigenic human isolates. Predominant ribotypes: 106 (9%), 002/2 (7%), 014 (6%), with 0.4% of PCR ribotype 027. Completion of an ANR project on contamination risks in cattle, pig and poultry slaughterhouses and participation in the European Orchidée project.
- Other anaerobes: 141 human strains handled (135 isolates, 6 specific pathogen screenings), including one *C. perfringens* foodborne outbreak diagnosis.

Key achievements:

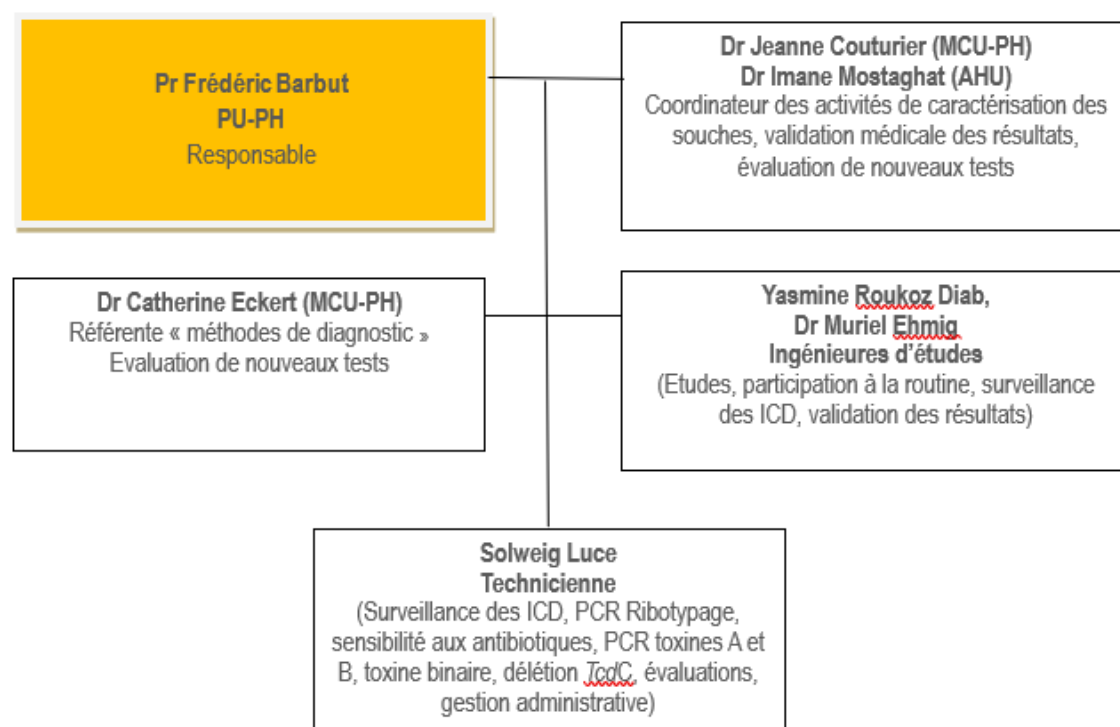
- Critical management of 13 foodborne botulism outbreaks in 2025 (vs. 8 in 2024).
- Enhanced *C. difficile* surveillance with systematic identification of high-risk ribotypes.
- Direct contribution to alerts (nosocomial infections, food poisoning,...) and clinical guidelines through typing and resistance data.
- Continuous monitoring of virulence factors and antimicrobial resistance across diverse anaerobic species.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme CNR laboratoire coordonnateur :



Organigramme laboratoire associé :



Mission et Organisation

Il n'y a pas eu de changement dans les missions du CNR bactéries anaérobies botulisme et de son laboratoire associé *C. difficile*.

L'année 2025 a été marquée par le départ de la responsable du laboratoire coordinateur, Dr Christelle Mazuet. La prise de responsabilité par intérim du CNR a été assurée par la responsable technique ingénieure de recherche Mme Laure Diancourt durant toute l'année 2025 et le recrutement du Dr Marlène Amara en juin 2025, pour une prise de fonctions en janvier 2026. L'assistant administratif du CNR, M. Grégoire Launay, a été remplacé en mars 2025 par Mme Rahil Chougui. Il n'y a pas eu de changements majeurs dans l'équipe du laboratoire associé durant l'année 2025.

Démarche Qualité

Le CNR Bactéries anaérobies et botulisme 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 apportent ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction Médicale ;
- 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 2022 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.

Le laboratoire associé *C. difficile* est intégré au DMU BioGemH (AP.HP Sorbonne Université) qui est accrédité sur le management de la qualité selon la norme 15189 v2022 (site COFRAC, N° accréditation 8-2542).

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles qualité externes (CQE). Pour les analyses de référence et d'expertises pour lesquelles il n'y a pas de programme commercial, les CNR organisent des essais inter-laboratoires (EIL) avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

Ainsi, pour le botulisme, le CNR participe chaque année et pour la 10ème année consécutive à un EIL avec l’Institut de recherche biovétérinaire de Wageningen (WBVR, The Netherlands), le Laboratoire National du Botulisme et autres Clostridies zoonotiques belge (Institut de Santé, Sciensano) et plus récemment l’ANSES (LNR Avian Botulism, France) afin d’évaluer, de comparer et d’échanger sur la capacité et la méthodologie de ces différents laboratoires pour le diagnostic du botulisme humain et animal. Il est important de préciser qu’au regard des contraintes de réglementation ANSM liées à la cession, importation, exportation et transport des Microorganismes et Toxines (MOT), ces essais sont lourds et très onéreux à organiser et réaliser. En 2025, l’EIL a été organisé par Sciensano. Les résultats obtenus par le CNR pour les 5 échantillons artificiellement contaminés par de la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* étaient tous conformes.

Pour la partie *C. difficile*, le laboratoire associé participe chaque année et pour la 11ème année consécutive en 2025, à un EIL en collaboration avec le Centre National de Référence pour *Clostridioides difficile* en Belgique (Sciensano, Pr Ahalieyah Anantharajah). Le panel était constitué de 3 souches A, B et C choisies parmi les 23 souches de référence de *Clostridioides difficile* provenant de la collection européenne établie par J. Brazier-E. Kuijper. La recherche des facteurs de virulence (délétion dans le gène *tcdC*, gènes codant la toxine binaire) a également été incluse dans le contrôle de qualité. Ce contrôle de qualité a permis de mettre en évidence une excellente concordance entre les méthodes de typage et de détection des facteurs de virulence utilisées en Belgique et les méthodes utilisées en France.

Pour la partie souches anaérobies, le CNR participe aux CQE commerciaux ProBioQual. En 2025, tous les résultats étaient également conformes.

L’année qualité 2025 du CNR s’est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Revue qualité	04 avril 2025
Revue de direction LREMS	24 juin 2025
Audits internes qualité et technique	24 novembre 2025
Audit de surveillance COFRAC	14-18 Avril 2025
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	06 janvier 2026

Lors de l’évaluation de renouvellement COFRAC d’avril 2025, les évaluateurs ont accordé leur confiance au LREMS qui a démontré lors de son évaluation une réponse aux exigences qualité et techniques de la version 2022 de la norme ISO 15189.

Perspectives 2026 : Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	Janvier-avril 2026
Audits internes qualité et technique	Janvier - décembre 2026
Revue de direction LRE-MS	à planifier
Audit de surveillance	Mars 2027

2. Activités d'expertise

Domaine	Activité	Résultats
Botulisme	Prise en charge de 767 prélèvements à visée diagnostique : 503 humains, 225 alimentaires, 9 environnementaux, 30 vétérinaires	Détection de 11 foyers de botulisme alimentaire en France et 2 foyers à l'étranger, 1 foyer animal, 2 cas iatrogènes ; aucun cas de botulisme infantile
<i>Clostridioides difficile</i>	Analyse de 726 prélèvements (humains, animaux, environnementaux, alimentaires)	Isolement de 483 souches toxigènes d'origine humaine ; 0,4 % (2 isolats) appartenant au PCR-ribotype 027. Principaux PCR-ribotypes: 106 (9 %), 002/2 (7 %), 014 (6 %)
Autres bactéries anaérobies	Analyse de 141 souches d'origine humaine (135 isolats + 6 prélèvements pour recherche de pathogènes spécifiques)	Identification et caractérisation de la virulence et de la résistance des souches étudiées
Toxi-infection alimentaire collective (hors botulisme)	9 Prélèvements analysés	1 foyer de TIAC

2.1 Evolution des techniques

Pour les bactéries anaérobies hors *C. difficile* :

Paramétrage et mise en production d'un nouveau SIL (passage du logiciel Lagon au logiciel Glims) avec mise en production en juin 2025.

Installation d'un lecteur de plaques de CMI par microdilution en milieu liquide (appareil Vizion, ThermoFisher) : mise en production en septembre 2025 avec connexion au SIL en mars 2026.

Pour *C. difficile*:

Détermination de la sensibilité des souches à la fidaxomicine (méthodes de diffusion en milieu gélosé).

Détermination de la CMI de la fidaxomicine par une méthode de dilution en microplaques. Etude de la concordance entre les deux méthodes en cours en 2026.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

C. perfringens :

Projet d'évaluation d'un test rapide immunochromatographique (Point-of-Care) pour le diagnostic d'intoxication alimentaire collective (TIAC) à *Clostridium perfringens* productrices d'entérotoxine CPE (*Clostridium perfringens* enterotoxin) développé par le CEA. Tests débutés en 2025, en cours en 2026.

C. difficile :

Evaluation de l'automate Standard M10 (2024-2025, Eurobio)

Evaluation de l'automate Vivalytic *C. difficile* (Bosch 2025-2026) et du panel Vivalytic diarrhée nosocomiale (*C. difficile*, Rotavirus et Norovirus)

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Néant

2.4 Collections de matériel biologique

Cf Annexe 4

2.5 Activités d'expertises

➤ CNR

En 2025, le laboratoire coordonnateur a analysé 767 prélèvements à visée diagnostique pour le botulisme contre 661 en 2024 (+16%) : 503 humains, 225 alimentaires, 9 environnementaux, 30 vétérinaires.

Il a analysé un total de 142 souches et 26 prélèvements (humain + vétérinaire + alimentaire) dans le cadre de son expertise sur les souches anaérobies. Leur origine est détaillée dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1: Activité d'expertise et analyses effectuées sur les prélèvements et souches analysées

	Type de prélèvements	Total reçu au CNR	Origine des demandes				
			LABM	Laboratoires Hospitaliers	Vétérinaires	Industriels	DDPP
Expertise diagnostique et dépistage du botulisme	Prélèvements humains	503	207	279			17
	Aliments (diagnostic)	59	3	4			52
	Aliments (dépistage*)	166				166	
	Echantillons environnementaux (diagnostic)	0					
	Echantillons environnementaux (dépistage*)	9				9	
	Echantillons animaux (diagnostic)	30			30		
Expertise typage, virulence et résistance bactéries anaérobies hors botulisme et <i>C. difficile</i>	Souches d'origine Humaine	135	19	116			
	Prélèvements d'origine Humaine	6		6			
	Souches d'origine Vétérinaire	6			6		
	Prélèvements d'origine Vétérinaire	15			15		
	Souches d'origine Alimentaire	1				1	
	Aliments	5					4 + 1 autre

*Les échantillons de dépistage correspondent à des recherches de toxine botulique dans les aliments par les industriels dans un contexte de commercialisation de produits à risque.

Le laboratoire coordonnateur s'est fixé pour objectif de rendre les résultats écrits de :

- Diagnostic de botulisme humain dans un délai maximum de 4 jours pour la recherche de toxine botulique (sérum, selles, aliments) et de 7 jours pour la recherche de *Clostridium botulinum* (selles, aliments). Dans les faits, les résultats sont communiqués aux cliniciens en temps réel en cas de positivité (le plus souvent en moins de 24h) par téléphone et/ou mail avec l'application sécurisée « BlueFiles » ou sur une adresse MSSanté de façon systématique lorsque le diagnostic biologique de botulisme est confirmé ainsi que pour tous les patients hospitalisés en réanimation.
- Expertises de souches bactériennes : 2 semaines, dans les faits ce délai est respecté hors périodes de vacances ou investigations complexes.

➤ Laboratoire associé

En 2025, le laboratoire associé a analysé 726 prélèvements contre 965 en 2024 (-24,8%).

Parmi ces prélèvements:

- 180 concernaient des prélèvements de patients envoyés au CNR pour analyse (souches de routine),
- 440 concernaient des selles de patients du GH AP-HP. Sorbonne Université et ont été inclus dans des études (hôpitaux « sentinelles »),
- 106 concernaient des prélèvements divers (animal / environnement / animaux / aliments) adressés au CNR dans le cadre d'études spécifiques (ANR Clost'Abat, projet Clost'Envir...).

Le tableau 2 présente le nombre de souches humaines reçues par le laboratoire associé en 2025 ainsi que les différentes analyses réalisées sur ces souches.

Tableau 2: Activité d'expertise sur *C. difficile* et analyses effectuées sur les souches humaines analysées

Année	2025
Nb de prélèvements humains analysés	620
Nb de souches de <i>C. difficile</i>	565
Nb de souches toxinogènes	483
Recherche du fragment A3	39%*
Recherche du fragment B1	39%*
Recherche de la toxine binaire	39%*
Recherche délétion dans <i>tcdC</i>	39%*
Antibiogramme	30%*
PCR-ribotypage	100%

*: seul le PCR-ribotypage est réalisé de façon systématique sur les prélèvements de patients hospitalisés à Sorbonne Université (AP-HP). Le caractère toxigène de la souche est déterminé en fonction du ribotype et du résultat de l'analyse GeneXpert. En cas de discordance, la recherche des fragments A3, B1, de la toxine binaire et de la délétion dans *tcdC* est réalisée.

Le laboratoire associé s'est donné pour objectif de rendre les résultats au laboratoire demandeur sous 10 jours ouvrés à partir de la date de réception. En 2025, la durée médiane de restitution était de 9 jours, soit une

augmentation d'un jour par rapport à 2024. En 2025, plus de 38% des prélèvements reçus étaient des selles, des géluses profondes, des fecal swabs ou des biopsies, nécessitant des étapes supplémentaires pour isoler *C. difficile* en culture, entraînant une augmentation des délais entre la réception du prélèvement et le rendu des résultats.

En 2025, le laboratoire associé a reçu 98 souches d'origine environnementale à analyser, en plus des souches humaines, dans le cadre du projet Clost'Envir et d'un projet de recherche sur la contamination des stations d'épuration par des bactéries pathogènes. Ces souches ont été analysées par PCR multiplex, PCR ribotypage et antibiogramme. L'analyse des souches environnementales est toujours en cours au moment de la rédaction de ce rapport d'activité.

2.6 Activités de séquençage

L'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes. La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

En 2025, le CNR a séquencé 9 souches de *C. botulinum** dont 5 souches d'origine humaine, 171 souches de *C. difficile*, dont 4 souches d'origine animale (2,3%) et 167 souches d'origine humaine (97,7%) et 157 souches d'autres bactéries anaérobies dont 135 d'origine humaine.

* Cas particulier du séquençage des Microorganismes et Toxines (MOT) :

Clostridium botulinum, étant classé dans la liste I des MOT soumis à réglementation, le séquençage de son génome ne peut être réalisé que sur une plate-forme dont les locaux, l'activité sur les MOT et les personnels ont été autorisés par l'ANSM. Depuis 2019, le séquençage des génomes de *Clostridium botulinum* est réalisé par le pôle de génotypage (PGP) de la CIBU, dont le responsable Jean-Claude Manuguerra est titulaire des autorisations nécessaires délivrées par l'ANSM.

Les analyses à partir du séquençage aident à :

- l'investigation d'épidémies,
- la surveillance épidémiologique de certains clones,
- la caractérisation fine de certaines souches atypiques de *C. difficile* (notamment au niveau du PaLoc),
- l'identification précise par calcul du score ANI,
- L'analyse phylogénétique,
- L'analyse du résistome et des gènes de virulence

Séquençage utilisé par le CNR :	
Analyses bio-informatiques conduites : cgMLST, wgMLST, serogroupe / serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...	
Première ligne : Résistome, toxinotypage Deuxième ligne : Analyse phylogénétique	
☒ En Première ligne	☒ En complément d'autres techniques : Antibiogramme, PCR ribotypage, PCR spécifiques

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies (par pathogène)			
Nom du pathogène : <i>Clostridium botulinum</i>		Nombre de souches séquencées par an : 9	
Les séquençages ont-ils été suivis d'une investigation épidémiologique menée par les équipes de Santé publique France ou d'une ARS?		☒ OUI	☐ NON
Nom du pathogène : <i>C. difficile</i>		Nombre de souches séquencées par an : 30	
Les séquençages ont-ils été suivis d'une investigation épidémiologique menée par les équipes de Santé publique France ou d'une ARS?		☐ OUI	☒ NON
Séquençage utilisé à des fins de surveillance (par pathogène)			
Nom du pathogène : <i>C. difficile</i>		Nombre de souches séquencées par an : 178	
Modalités de sélection des souches pour séquençage :			
☐ Aucune sélection			
☒ Etudes épidémiologiques transversales répétées à une fréquence donnée			
☐ Echantillonnage : Préciser le type et, le cas échéant, le pourcentage des souches séquencées			
☐ Autre :			
Nom du pathogène : Toutes les souches adressées pour expertise		Nombre de souches séquencées par an : 135 souches d'origine humaine, 22 souches d'origine animale	
Modalités de sélection des souches pour séquençage :			
☒ Aucune sélection			
☐ Etudes épidémiologiques transversales répétées à une fréquence donnée			
☐ Echantillonnage : Préciser le type et, le cas échéant, le pourcentage des souches séquencées			
Capacité de séquençage			
Y-a-t-il des capacités de séquençage rapide à disposition du CNR ? (Pour un rendu de résultats en moins 24h après réception du prélèvement, pour les pathogènes viraux ou bactérien et en mois de 48h pour les eucaryotes parasitaires)			
☐ NON			
☐ OUI au sein du CNR			
☒ OUI au sein de l'établissement qui héberge le CNR <i>mais le CNR n'est pas prioritaire pour l'utilisation de ces capacités</i>			
À combien de séquences NGS par mois, en moyenne, estimez-vous votre capacité de séquençage en fonctionnement normal ? (En prenant en compte les ressources humaines à y dédier, sans renfort supplémentaire ou nombre important d'heures supplémentaires)			
Actuellement le CNR fait séquençer et analyse en moyenne une trentaine de souches par mois.			

À combien de séquences NGS par mois estimez-vous votre capacité de séquençage maximale en cas de crise ponctuelle ?
(En prenant en compte les ressources humaines à y dédier, sans renfort supplémentaire ou nombre important d'heures supplémentaires) ?

En cas de crise ponctuelle, le CNR serait capable de faire séquençer et d'analyser une centaine de souches (hors *C. botulinum*) par mois. Pour *C. botulinum*, le séquençage est soumis à réglementation mais la mobilisation de la CIBU est possible en cas d'urgence sanitaire.

Le CNR a-t-il accès à une ou plusieurs plateformes* transversales de séquençage ?

- ☐ NON
☒ OUI Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) (Institut Pasteur)

*Plateforme = structure externe au CNR, financée de manière indépendante, proposant des services de diagnostic moléculaire ou de séquençage à plusieurs laboratoires

Capacité de bio-informatique

Quels que soient les pathogènes séquencés

Le CNR dispose-t-il de ressources humaines en bio-informatique internes dédiées à ses activités ?

(Ex. : un(e) bio-informaticien(ne) ou une équipe dédiée)

- ☒ OUI pour le Laboratoire associé uniquement
☐ NON - Le CNR peut-il s'appuyer dans ce cas sur des équipes externes pour le développement d'outils bio-informatiques ou adapter les outils existants à ses besoins ? Oui, le CNR peut s'appuyer sur : Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI) de L'Institut Pasteur ; utilisation de BioNumerics et logiciels « maison », Enterobase et pipeline local ; INSERM 1139, Faculté de Pharmacie

Le CNR utilise-t-il des outils commerciaux de bio-informatique susceptibles de devenir obsolètes (ex. BioNumerics) ?

- ☐ NON
☒ OUI BioNumerics

Une stratégie de migration vers un autre outil ou de maintien en condition opérationnelle est-elle prévue ? Oui projet de migration vers un serveur de type BIGSdb sécurisé

Capacité de stockage des données de séquençage

Stockage des séquences brutes

Comment gérez-vous le stockage de séquences brutes (fichiers FASTQ) générées par votre CNR ?

- | | | |
|---|---|--|
| ☒ Stockage en interne
<i>Au sein d'un seul laboratoire</i> | ☐ Stockage dans un serveur à accès exclusif du CNR
<i>Accessible aux laboratoires associés au CNR</i> | ☐ Stockage dans une base de données externe |
|---|---|--|

Jugez-vous votre système de stockage de séquences brutes « viable financièrement » à long terme au regard de votre activité de séquençage ?

- ☒ OUI malgré l'achat régulier d'espace de stockage
☐ NON Préciser

Mise à disposition des séquences dans des bases de données

Ouverture des données (au-delà des missions CNR) pour la Recherche et la surveillance internationale
NE CONCERNE PAS le dépôt dans les bases institutionnelles comme EpiPulse ou MeaNS2 (base de données de rougeole de l'OMS)

Le CNR dépose-t-il ses données de séquençage (séquences et métadonnées associées)
dans des bases de données externes d'accès restreint (ex. : Enterobase, GISAID...) ou libre (ex. : ENA) ?

☐ NON

☒ OUI – Séquences brutes

☒ OUI – Génomes consensus

☐ OUI – Résultats de séquençage
mais pas de partage de séquences

Enterobase pour *C. difficile* en temps proche du réel et ENA pour les autres espèces après valorisation uniquement.

☐ Dépôt(s) des résultats en
temps réel

☒ Dépôt(s) des résultats
en temps proche du réel
(Dans la limite d'un mois post-séquençage)

☒ Dépôt(s) après valorisation
(Publication scientifique, rapport...)

Autres informations concernant les activités de séquençage : Indiquer dans la rubrique « Autres remarques à destination du comité des CNR » de l'annexe 3 (non rendue publique) toutes autres informations concernant les activités de séquençage non renseignées ci-dessus. Enterobase est géré par l'Université de Warwick et Galaxy Europe (utilisé pour les analyses autres que cgMLST (SNP, ST, résistome ...), est géré par l'Université de Freiburg.

3. Activités de surveillance

Éléments clefs 2025 en termes de surveillance :

11 foyers de botulisme humain en France (8 foyers en 2024) dont 1 foyer complexe avec de nombreux rappels de produits industriels (Tortillas importées d'Espagne)

3 aides au diagnostic de foyers de botulisme à l'étranger (Belgique, Madagascar, Lituanie)

Aucun cas de botulisme infantile (1 cas en 2024)

2 suspicions de botulisme iatrogène dont 1 cas confirmé

1 foyer de botulisme animal

1 TIAC à *C. perfringens* avec diagnostic humain

C. difficile: le clone épidémique 027 ne représente plus < 1 % des isolats,

stabilisation du clone RT638 (ribotype 052) émergent depuis 2023

Résistance aux antibiotiques : augmentation de la résistance au métronidazole (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Veillonella*) et aux bêtalactamines chez *Bacteroides*

3.1 Description du réseau de partenaires

➤ Réseau de partenaires pour le botulisme

Les échantillons nous sont adressés par l'intermédiaire des laboratoires hospitaliers ou laboratoires d'analyses privés sur demande du clinicien ou praticien traitant dans le cadre d'une suspicion de botulisme clinique ou pour étayer un diagnostic différentiel d'un syndrome neurologique de paralysie flasque descendante.

La répartition des partenaires s'étend sur toute la France y compris les territoires d'Outre-Mer. Certaines demandes d'analyse de botulisme proviennent de l'étranger (Suisse de manière régulière ; Belgique, Madagascar et Lituanie ponctuellement en 2025 dans le cadre d'investigation d'épidémies).

En cas de notification d'alerte botulisme, le bureau "alerte" de la DGS et la DGAL coordonnent des conférences téléphoniques entre les principaux partenaires (hospitaliers, Santé publique France, ARS, Services vétérinaires, DDPP, ANSES, ANSM) et le CNR qui participe activement à la gestion de la situation. Il faut souligner la bonne coordination entre Santé publique France et le CNR sur la gestion des foyers de botulisme et les enquêtes pour en déterminer l'origine.

Le CNR collabore étroitement avec l'ANSES pour le botulisme animal.

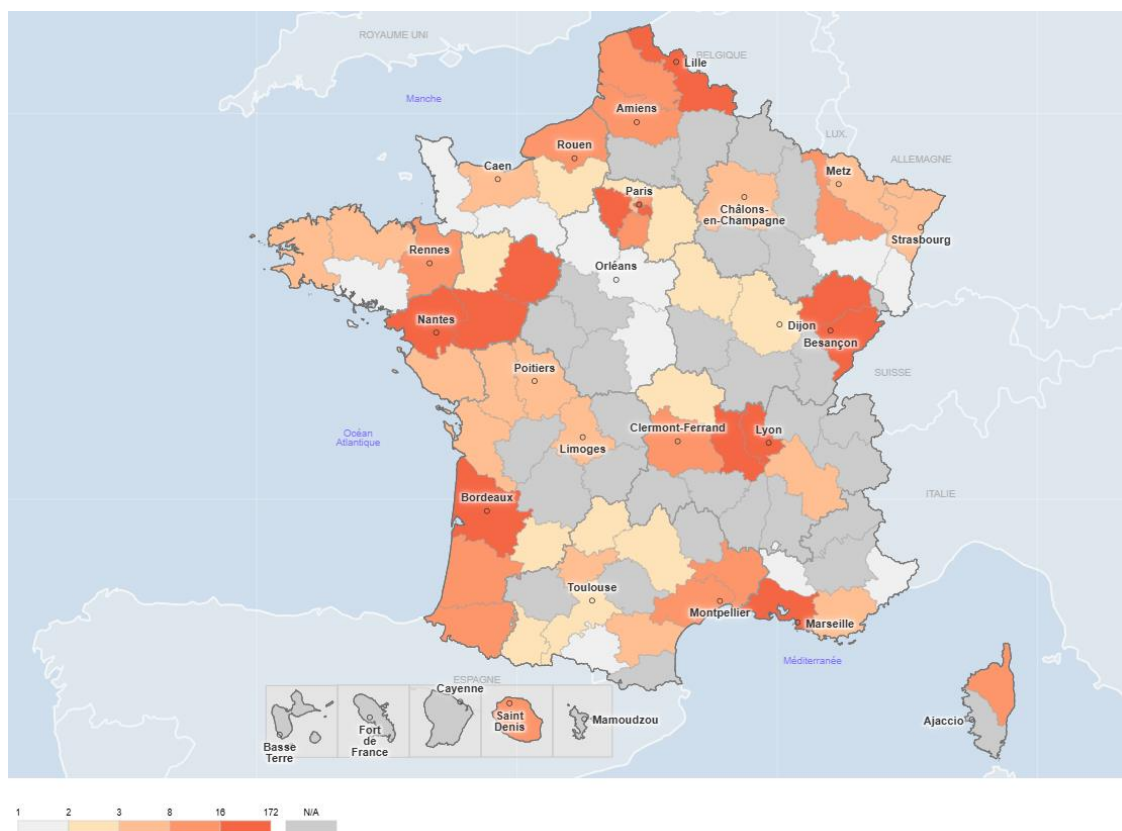


Figure 1 : Répartition géographique des prélèvements reçus pour suspicion de botulisme.

Remarque : une surreprésentation de prélèvements en provenance d'Ile de France est expliquée par la centralisation technique de certains échantillons issus de centres de prélèvements de LABM régionaux sur des plateaux techniques situés en région parisienne.

- Réseau de partenaires pour les autres bactéries anaérobies

Les souches de bactéries anaérobies (toutes espèces confondues) nous sont adressées par l'intermédiaire des laboratoires hospitaliers ou laboratoires d'analyses privés, répartis sur toute la France, pour confirmation d'identification, vérification de l'antibiogramme et/ou recherche de facteurs de virulence dont toxinotypie et/ou mécanismes de résistance selon l'espèce.

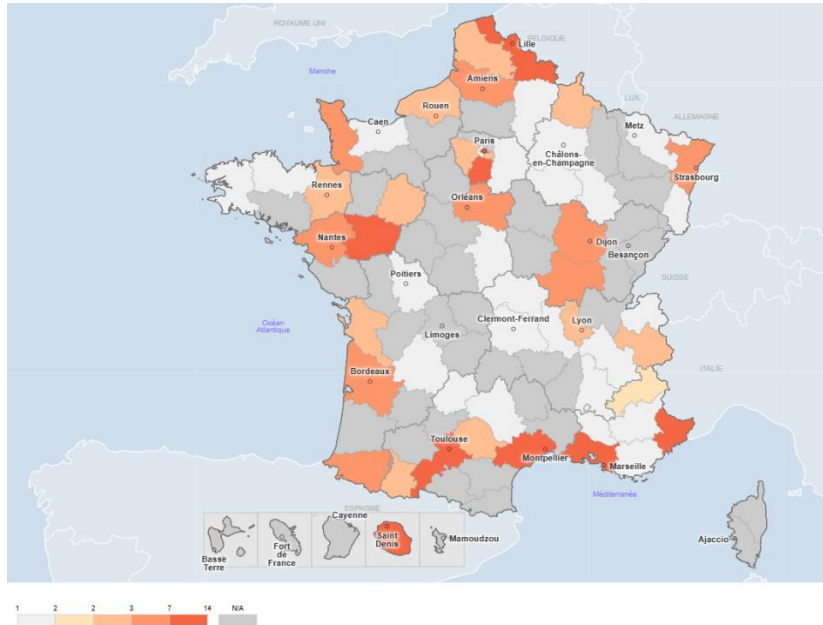


Figure 2 : Répartition géographique des échantillons reçus pour expertise de souche anaérobies.

Tableau 3: Souches envoyées par les partenaires

Genre/Espèce bactérienne	Motif principal d'adressage des souches	Contexte et précisions complémentaires
<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>	Confirmation de la résistance aux antibiotiques	Bétalactamines principalement. Réseau de surveillance de la résistance débuté en décembre 2023 via le CA-SFM et le Col.BVH
<i>Prevotella</i> et <i>Veillonella</i>	Confirmation de la résistance aux antibiotiques	Principalement métronidazole
<i>Fusobacterium</i>	Recherche de facteurs de virulence	—
<i>Actinomyces</i> et espèces apparentées (<i>Schaalia</i> , <i>Winkia</i> , etc.)	Investigation d'infections chroniques	—
<i>Clostridium</i>	Toxinotypie et recherche de facteurs de virulence	—
<i>Clostridioides difficile</i>	Veille épidémiologique et typage	Typage des souches isolées des cas signalés aux autorités sanitaires (e-sin)*: formes sévères (cf. définitions InVS 2006) ou cas groupés/épidémies. Motifs d'envoi : infection communautaire motivant l'hospitalisation, transfert en réanimation, décès lié à l'infection dans les 30 jours, hyperleucocytose >20 000/mm ³ , traitement chirurgical, épidémie ou cas groupés
Autres espèces	Aide à l'identification ou confirmation d'une résistance inattendue	Métronidazole en particulier

*Il est fréquent que les souches reçues n'aient pas fait l'objet d'un signalement aux autorités sanitaires, le motif d'envoi qui doit être précisé sur la feuille d'accompagnement n'étant pas toujours renseigné.

Le tableau 4 indique les motifs d'envoi recensés pour tous les prélèvements reçus (ces critères ne sont pas exclusifs). Il est à noter que de plus en plus de laboratoires envoient des souches de *C. difficile* pour confirmation du PCR-ribotype 027 lorsque le test GenXpert a rendu une identification présomptive 027. Ces envois permettent également de surveiller la diffusion de la souche 027 épidémique en France. D'autres laboratoires envoient des souches donnant des résultats discordants entre la recherche de toxines par PCR et les tests immuno-chromatographiques/immuno-enzymatiques.

Tableau 4: Motifs d'envoi des souches de *C. difficile*

Motifs d'envoi (non exclusif)	2025 (180 prélèvements)		
	oui	non	NR*
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	15	70	95
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	2	85	93
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	1	84	95
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	15	63	102
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	0	84	96
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	104	34	42

*NR : non renseignés

La suspicion d'épidémies ou de cas groupés constitue le motif le plus fréquent d'envoi des souches au laboratoire expert pour typage. Le nombre important de motifs d'envoi non renseigné provient du fait que près de 33% des prélèvements sont envoyés par des laboratoires de ville, qui n'ont pas forcément accès au dossier complet du patient pour compléter les renseignements.

Parmi les souches envoyées pour expertise (c'est-à-dire hors souches du GH Sorbonne Université), le plus grand nombre de prélèvements (n=30) proviennent de la région Pays-de-la-Loire. Cette observation est en relation avec l'envoi systématique des souches de *C. difficile* par certains laboratoires de ville. La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée par la figure 3.

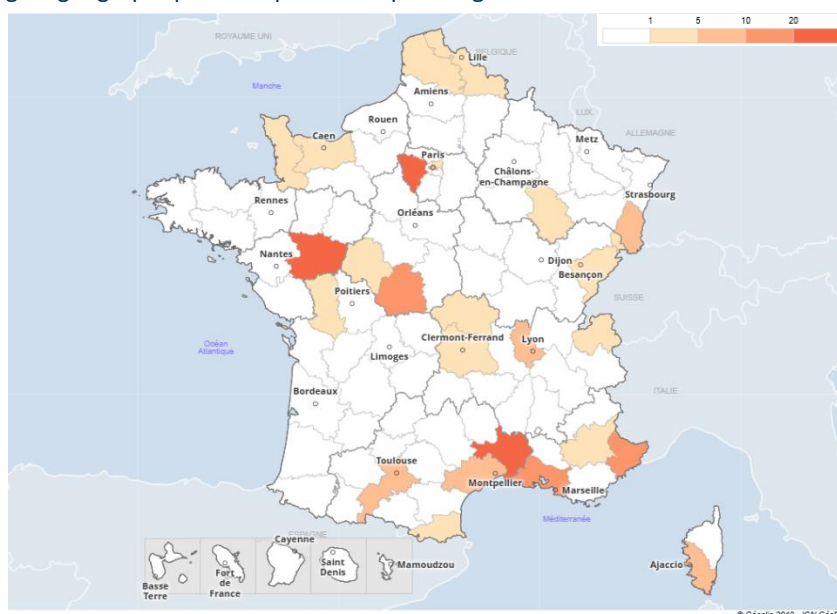


Figure 3: Répartition des prélèvements (n=180) envoyés par département en 2025.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Tous les foyers de botulisme alimentaire en France en 2025 étaient liés à du botulisme de type B, sauf 1 foyer lié à du botulisme de type A. Les foyers de Madagascar et de Lituanie étaient liés à du botulisme de type E, le foyer de Belgique était lié à du botulisme de type F.

Parmi l'ensemble des souches de bactéries anaérobies reçues en 2025, la variété d'espèces est stable, avec une augmentation du nombre de souches de *Veillonella* reçues en 2025. La moyenne d'âge des patients infectés par ces souches était de 58 ans, avec un ratio homme/femme de 2. Cette augmentation est liée à l'augmentation du nombre de souches adressées pour résistance au métronidazole au sein de ce genre.

Le nombre de souches du genre *Clostridium* est stable sans augmentation du nombre de *C. tetani* ni de *C. perfringens*. Le CNR a participé à l'investigation d'un cluster d'entérocolite nécrosante du nourrisson à *Clostridium butyricum* dans un service de néonatalogie d'Ile de France (4 cas).

Il n'y a pas eu de signalement particulier concernant une augmentation de cas pour une espèce spécifique en 2025. Compte tenu de la variété d'espèces et du faible nombre d'isolats pour la plupart des espèces (cf tableau 5), il est difficile d'établir une tendance selon les critères démographiques des patients.

Tableau 5: Répartition des souches par genre et espèce, comparaison des années 2024 et 2025

Genre	Genre 2024	Espèces 2024	Genre 2025	Espèces 2025
<i>Actinomyces</i>	1	<i>A. gerencseriae</i>	2	<i>Actinomyces</i> sp., <i>A. turicensis</i>
<i>Alloporobacillus</i>	-	-	1	<i>A. halotolerans</i>
<i>Alistipes</i>	1	<i>A. communis</i>	-	-
<i>Anaerococcus</i>	3	<i>A. degneri</i> , <i>A. provencensis</i>	-	-
<i>Bacillus</i>	-	-	1	<i>B. cereus</i>
<i>Bacteroides</i>	42	<i>B. caccae</i> , <i>B. faecis</i> , <i>B. fragilis/hominis</i> , <i>B. humanifaecis</i> , <i>B. koreensis</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. pyrogenes</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. xylanisolvans</i>	35	<i>B. faecis</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>B. hominis</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. salyersiae</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. uniformis</i>
<i>Capnocytophaga</i>	-	-	2	<i>C. canimorsus</i>
<i>Clostridioides</i>	1	<i>C. mangenotii</i>	-	-
<i>Clostridium</i> / <i>Paraclostridium</i>	38	<i>C. argentinense</i> , <i>C. baratii</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. innocuum</i> , <i>C. moniliforme</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. tepidum</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. sp.</i> , <i>P. sordelii</i>	35	<i>C. baratii</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. faecium</i> , <i>C. moniliforme</i> , <i>C. paraprutificum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. septicum</i> , <i>P. sordelii</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. sp.</i>
	3	<i>Dont C. tetani</i>	1	<i>Dont C. tetani</i>
	24	<i>Dont C. perfringens</i>	18	<i>Dont C. perfringens</i>
	5	<i>C. aches</i>	-	-
	1	<i>D. desulfuricans</i>	-	-
	1	<i>D. micraerophilus</i>	-	-
	-	-	3	<i>E. lenta</i>
	1	<i>E. clostridioformis</i>	-	-
	-	-	1	<i>F. cylindroides</i>
	1	<i>F. contorta</i>	-	-
<i>Finegoldia</i>	2	<i>F. magna</i>	1	<i>F. magna</i>
<i>Fusobacterium</i>	3	<i>F. necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i> , <i>F. vincentii</i>	4	<i>F. necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>F. vincentii</i> , <i>F. watanabei</i>
<i>Hoylella</i>	-	-	1	<i>H. nanciensis</i>
<i>Hungatella</i>	-	-	1	<i>H. hathewayi</i>
<i>Lacrimispora</i>	1	<i>L. indolis</i>	-	-
<i>Lancefieldella</i>	-	-	1	<i>L. sp. Marseille Q7238</i>
<i>Oligusella</i>	-	-	1	<i>O. massiliensis</i>
<i>Paenibacillus</i>	-	-	1	<i>P. pseudotheri</i>
<i>Parabacteroides</i>	6	<i>P. distasonis</i>	2	<i>P. distasonis</i>
<i>Parvimonas</i>	2	<i>P. micra</i>	-	-
<i>Phocaeicola</i>	4	<i>P. dorei</i> , <i>P. vulgatus</i>	4	<i>P. dorei</i> , <i>P. vulgatus</i>
<i>Porphyromonas</i>	-	-	1	<i>P. asaccharolytica</i>
<i>Prevotella</i>	11	<i>P. bivia</i> , <i>P. disiens</i> , <i>P. massiliensis</i> , <i>P. melaninogenica</i>	11	<i>P. bivia</i> , <i>P. disiens</i>
<i>Schaalia</i>	-	-	4	<i>S. funkei</i> , <i>S. meyeri</i> , <i>S. odontolytica</i>
<i>Segatella</i>	-	-	1	<i>S. salivae</i>
<i>Turicibacter</i>	2	<i>T. sanguinis</i>	-	-
<i>Veillonella</i>	6	<i>V. hominis</i> , <i>V. infantum</i> , <i>V. parvula</i> , <i>V. rogosa</i>	12	<i>V. atypica</i> , <i>V. dispar</i> , <i>V. hominis</i> , <i>V. montpellierensis</i> , <i>V. parvula</i> , <i>V. rogosa</i> , <i>V. sp.</i>
<i>Winkia</i>	2	<i>W. neuvi</i>	-	-

En 2025, les souches de *C. difficile* toxinogènes (n= 483) provenaient de selles (100%). Deux cent cinquante-sept (257/483 soit 53%) souches de *C. difficile* toxinogènes ont été isolées chez des femmes et deux cent vingt-six (226/483 soit 47%) chez les hommes. On note que 57,1% (276/483) des patients ont plus de 65 ans (versus 62,6% en 2024). La distribution en âge des patients chez qui ces souches toxinogènes ont été isolées est représentée sur la figure 3.

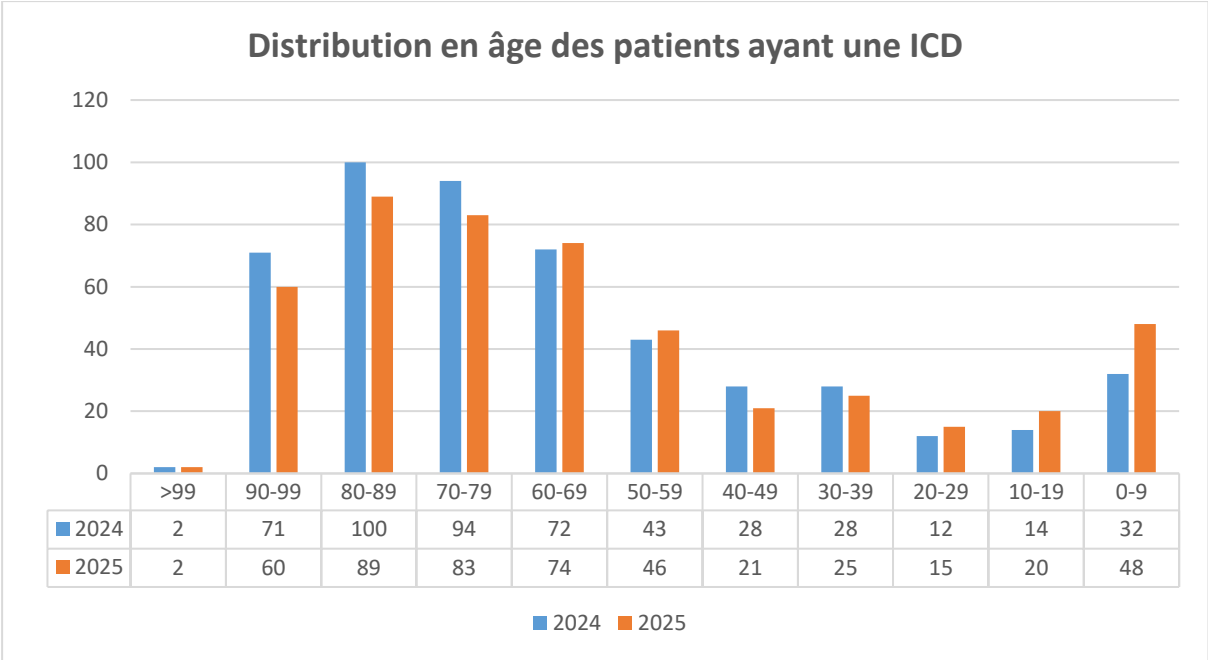


Figure 4: Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxinogène a été isolée en fonction de l’âge (années 2024 et 2025).

On note une très grande variété de PCR ribotypes. Les souches de PCR-ribotype 106, 002/2, 014, 211, 126, 010, 651 et 001 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 37% (soit 209/565) des souches (Tableau 6 et figures 5 et 6). On note une diminution de la proportion de souches du ribotype émergent 638.

Tableau 6: Répartition des souches humaines en fonction des PCR-ribotypes caractérisés en France

PCR-ribotype	Nombre de souches (%)		
	2025	2024	2023
106	49 (8,7)	45 (7,5)	26 (7,3)
002	37 (6,5)	43 (7,2)	21 (5,9)
014	36 (6,4)	37 (6,2)	35 (9,8)
211	19 (3,4)	18 (3,0)	9 (2,5)
126	18 (3,2)	13 (2,2)	15 (4,2)
010	17 (3)	27 (4,5)	8 (2,2)
651	17 (3)	11 (1,8)	5 (1,4)
001	16 (2,8)	10 (1,7)	1 (<1)
020	16 (2,8)	27 (4,5)	15 (4,2)
039	16 (2,8)	14 (2,3)	8 (2,2)
005	14 (2,5)	16 (2,7)	5 (1,4)
078	13 (2,3)	15 (2,5)	9 (2,5)
739	11 (1,9)	9 (1,5)	10 (2,8)
015	10 (1,8)	27 (4,5)	4 (1,1)
638	10 (1,8)	19 (3,2)	15 (4,2)
AI-84	9 (1,6)	10 (1,7)	6 (1,7)
Autres	257 (45,5%)	250 (41,9)	149 (41,9)
Non Déterminé	0	0 (<1)	0 (<1)
Total	565	597	356

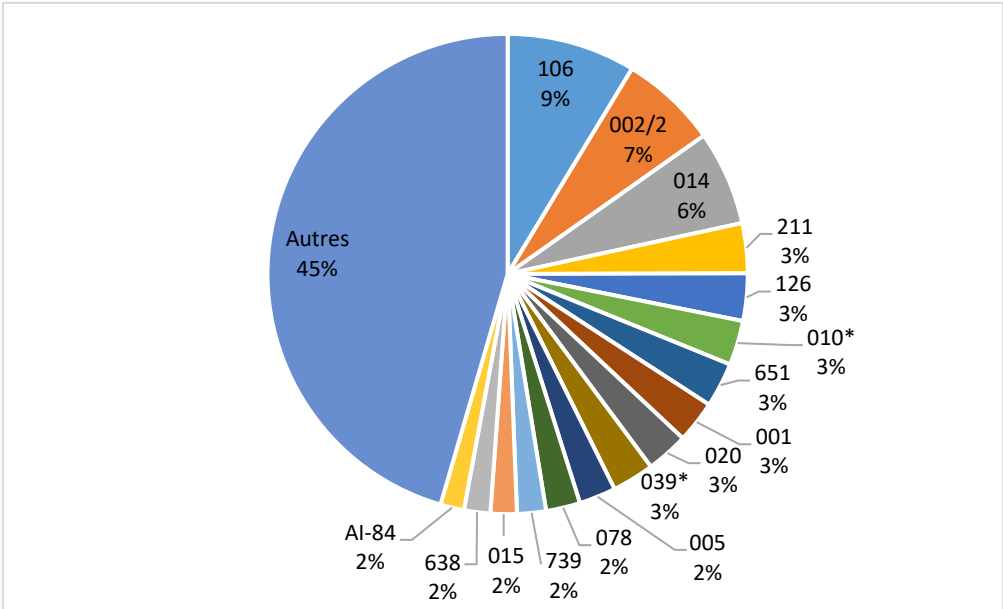


Figure 5: Répartition des PCR-ribotypes de toutes les souches de patients analysées en 2025. Les PCR-ribotypes ne comprenant que des souches non toxigènes sont indiqués par un astérisque *.

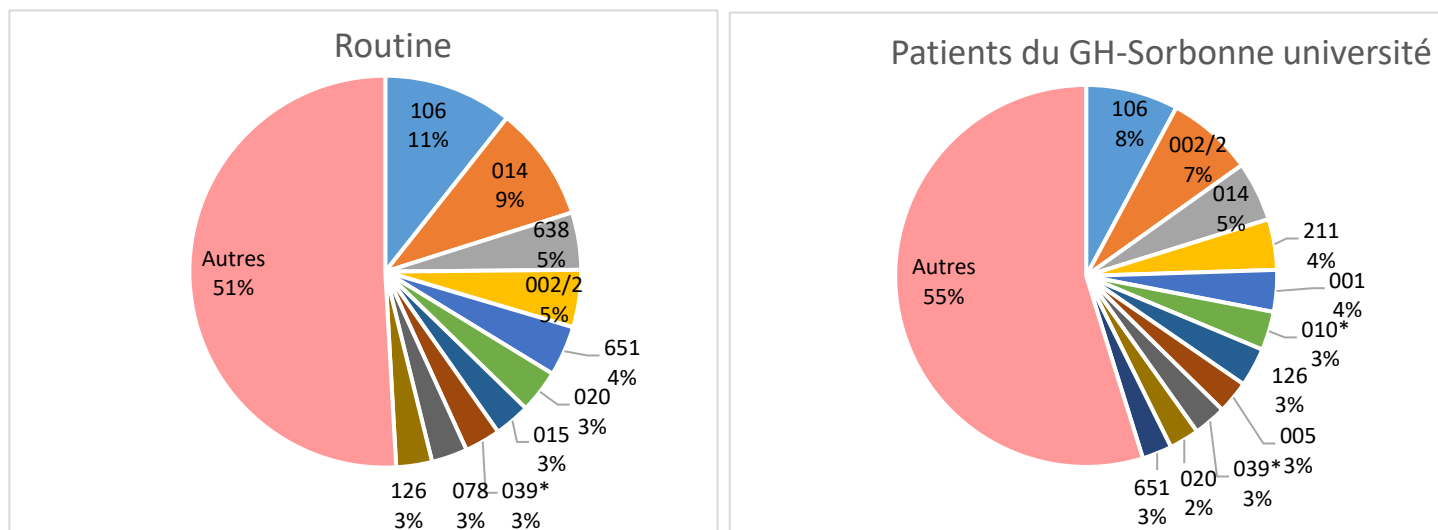


Figure 6: Répartition des principaux PCR-ribotypes en 2025 entre les souches de routine (reçues au CNR pour analyse) et les souches étudiées de patients du GH-Sorbonne Université (SU). Les PCR-ribotypes ne comprenant que des souches non toxigènes sont indiqués par un astérisque *.

Parmi les 483 souches de *C. difficile* toxigènes, 2 (0,4%) ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027 : une souche de PCR-ribotype 027 dit « historique », c'est-à-dire sensible à la moxifloxacine isolée à Marseille (13) en septembre 2025 et une souche de PCR-ribotype 027 dit « épidémique » c'est-à-dire résistante à la moxifloxacine et à l'érythromycine isolée à Mulhouse (68) en janvier 2025.

Le PCR-ribotype 106 est le ribotype le plus fréquemment retrouvé au sein des souches de routine suivi du PCR-ribotype 014. Le PCR-ribotype émergent 638 et le PCR-ribotype 002/2 arrivent à égalité en 3ème et 4ème position. Le PCR ribotype 002 est retrouvé dans plusieurs régions de France alors que le RT 638 n'a été isolé qu'en région parisienne (figure 7).

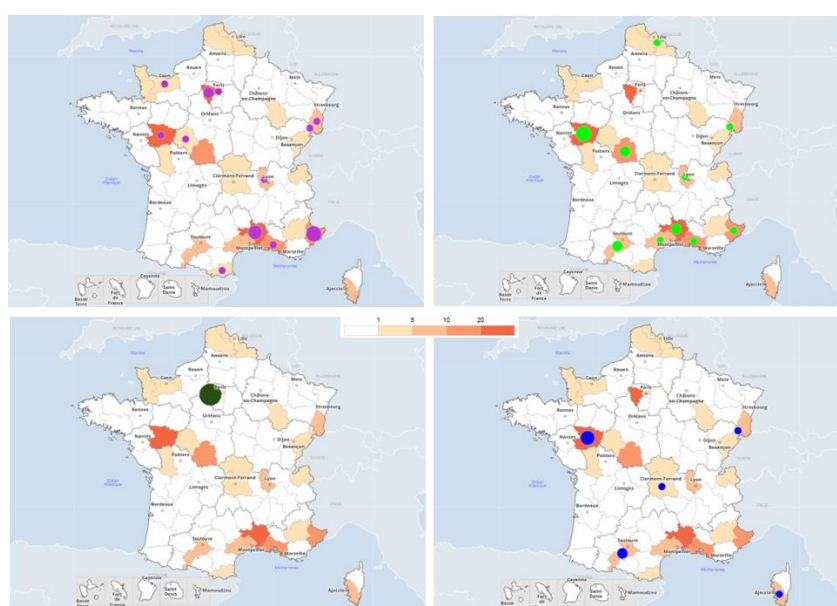


Figure 7: Répartition des souches de PCR-ribotype 106 (cercles violets), des souches de PCR-ribotype 014 (cercles vert clair), des souches de PCR-ribotype 638 (cercles vert foncé), des souches de PCR-ribotype 002/2 (cercles bleu).

Parmi les souches de *Clostridioides difficile* analysées cette année (souches de routine et d'études), 82 souches sont non toxigènes, et les ribotypes 010 et 039 sont dominants (Tableau 7). De nombreuses souches non toxigènes appartiennent à des ribotypes non répertoriés dans webRibo (« FR »).

Tableau 7: Ribotypes des souches humaines non toxigènes analysées en 2025

Ribotype	Nombre	Ribotype	Nombre	Ribotype	Nombre
010	17	746	3	031/1	1
039	14	205	2	AI-74	1
009	8	439	2	FR217	1
085	6	629	1	FR377	1
084	5	750	1	FR402	1
026	4	770	1	Autres FR	13

Au cours de l'année 2025, une légère diminution de la proportion de souches non 027 possédant les gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire a été observée (Tableau 8) par rapport à 2024.

Tableau 8: Evolution de la proportion de souches productrices de toxine binaire

	2025	2024	2023	2022
Nb de recherches <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	219	207	207	399
Nb de recherches positives <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	12,79% (28/219)	16,91% (35/207)	19,81% (41/207)	17,04% (68/399)
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	2	5	5	18
<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs chez les souches non 027 (%)	11,87% (26/219)	14,85% (30/202)	17,82% (36/202)	13,12% (50/381)

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

➤ CNR

À compter de septembre 2019, le CNR a instauré la réalisation systématique d'antibiogrammes dès réception ou isolement des souches. Cette évolution répond à l'accroissement des demandes – notamment concernant les genres *Bacteroides* et *Prevotella* – dans un contexte d'émergence de résistances au sein de ces genres bactériens. Les antibiogrammes sont réalisés par la méthode des disques en diffusion en milieu gélosé et les CMI sont déterminées en microdilution en milieu liquide (plaques à façon). Des bandelettes (gradient de diffusion en milieu gélosé) sont parfois réalisées pour compléter l'analyse d'une résistance en particulier ou pour investiguer une discordance entre les disques et la microdilution en milieu liquide. L'interprétation est réalisée selon les recommandations CA-SFM/EUCAST en vigueur (version 2024 pour l'année 2025).

Résistance au métronidazole :

Une augmentation du nombre total de souches confirmées résistantes au métronidazole est observée parmi les genres *Bacteroides* et apparentés (*Parabacteroides*, *Phocaeicola*), *Prevotella* et *Veillonella*, avec un total de 28 souches confirmées résistantes en 2025 sur 58 souches appartenant à ces genres reçues (48%), contre 14 sur 75 souches reçues (19%) en 2024. Le détail par genre est disponible ci-dessous :

Genre Bacteroides et apparentés (Parabacteroides, Phocaeicola) (N= 41)

En 2025, sur 41 souches étudiées, 12 souches ont été confirmées résistantes (26%) au métronidazole, contre 8 en 2024 pour 58 étudiées (13%). Parmi ces souches, 2 n'avaient pas de gène de résistance connu, les 10 autres souches étaient porteuses d'un gène *nim* (3 gènes *nimA*, 2 *nimD*, 3 *nimE*, 1 *nimL* et 1 gène morcelé).

Genre Veillonella (N=12)

En 2025, sur 12 souches étudiées, 8 souches ont été confirmées résistantes (67%) au métronidazole, contre 2 en 2024 pour 6 étudiées (33%). Parmi ces souches, 6 n'avaient pas de gène de résistance connu, les 2 autres souches étaient porteuses d'un gène *nimG*.

Genre Prevotella (N=11)

En 2025, sur 10 souches étudiées, 8 souches ont été confirmées résistantes (72%) au métronidazole, contre 4 en 2024 pour 11 étudiées (36%). Parmi ces souches, 7 n'avaient pas de gène de résistance connu, une souche était porteuse d'un gène *nimK*.

Résistance aux bêtalactamines :

Une augmentation du nombre total de souches confirmées résistantes aux bêtalactamines est observée parmi les genres *Bacteroides* et apparentés (*Parabacteroides*, *Phocaeicola*) en particulier. Le détail par genre est disponible ci-dessous :

Tableau 9: Pourcentage de résistance aux bêtalactamines des genres *Bacteroides* et apparentés :

Amoxicilline-acide clavulanique		Pipéracilline-tazobactam		Carbapénèmes*	
2024	2025	2024	2025	2024	2025
30/58=52%	25/41 = 61%	16/58 = 28%	14/41 = 34%	14/58 = 24%	13/41 = 32%

*Résistance aux trois carbapénèmes testés : ertapénème, imipénème et méropénème

Support génétique identifié :

Pour la résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique :

- 18 gènes *cfxA*
- 12 gènes *cfiA* et 1 association des gènes *cfxA* et *MUN*
- 1 souche sans support génétique identifié

Pour la résistance à pipéracilline-tazobactam :

- 10 gènes *cfxA*
- 11 gènes *cfiA*
- 1 association des gènes *cfxA* et *MUN*

Toutes les résistances aux carbapénèmes étaient expliquées par l'expression du gène *cfiA* (chromosomique chez les *Bacteroides* du groupe II, identification moléculaire : *Bacteroides hominis*) sauf pour une souche de *Parabacteroides chongii*, pour laquelle la résistance a été attribuée à l'association des gènes *cfxA* et *MUN-1*.

Résistance à la clindamycine :

En 2025, 34 souches sur les 151 reçues étaient résistantes à la clindamycine. Parmi celles-ci, 27 avaient un gène *erm* identifié (majoritairement *erm(F)*) et 2 souches de *Clostridium* portaient un gène *cfr*.

31 souches résistantes appartenaient aux genres *Bacteroides* et apparentés, *Clostridium* et *Prevotella* : en légère diminution par rapport aux 35 souches résistantes observées en 2024 au sein de ces mêmes genres. Les trois souches restantes étaient 2 souches d'*Egghertella lenta* et 1 souche de *Fingoldia magna*.

Résistance aux Fluoroquinolones :

Au total 32 souches étaient résistantes à la moxifloxacine, parmi lesquelles :

- 17 souches de *Bacteroides* et apparentés dont 6 sans mutation identifiée, les 11 autres souches présentaient une mutation de *gyrA* (9 mutations en position 82 dont une associée à une mutation en position 81 et 2 mutations en position 86)
- 12 *Prevotella* avec une seule mutation de *gyrA* identifiée (L82S)
- 2 *Veillonella* et 2 souches de bactéries anaérobies à Gram +, sans support génétique identifié.

Autres résistances :

- Six souches étaient résistantes à la rifampicine avec pour cinq d'entre elles une mutation du gène *rpoB* (2 souches de *Bacteroides hominis*, 1 souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* et 2 souches de *Clostridium butyricum*)
- Une souche de *Finegoldia magna* a été confirmée résistante au linézolide (présence d'un gène *cfr(B)*)
- Deux souches de *Bacteroides fragilis* étaient résistantes à la tigécycline, résistance pouvant être attribuée à la présence du gène *tetQ* chez des souches porteuses du gène *cepA*, sans certitude.

➤ Laboratoire associé

La détermination de la sensibilité des souches de *C. difficile* a été étudiée pour 171 souches humaines de *C. difficile* en 2025. La méthode des disques est utilisée pour les antibiotiques suivants :

- érythromycine et tétracycline (interprétation selon le CA-SFM 2013)
- clindamycine, moxifloxacine, chloramphénicol, rifampicine et tigécycline (interprétation selon le CA-SFM/EUCAST 2025)

Une détermination des CMI par méthode de bandelettes en gradients de diffusion en milieu gélosé (E-tests) est réalisée pour les antibiotiques suivants : métronidazole, vancomycine et clindamycine (interprétation selon le CA-SFM/EUCAST 2025).

Les pourcentages de résistance sont résumés dans le tableau 10 ci-dessous :

Tableau 10 : Pourcentage de résistance (R+I) des souches de *C. difficile* à l'érythromycine, à la clindamycine, à la moxifloxacine, à la tétracycline, au chloramphénicol, à la rifampicine et à la tigécycline.

*Les diamètres critiques ont été modifiés en 2025 par le CA-SFM

Moxifloxacine : 18 mm → 21 mm

Chloramphénicol : 23 mm → 50 mm

	Erythromycine	Clindamycine	Moxifloxacine	Tétracycline	Chloramphenicol	Rifampicine	Tigécycline
% de souches R+I	<22 mm	<15 mm	<21 mm	<19 mm	<50 mm	<19 mm	<21 mm
2023	27,9	96,6	16,2	5,6	10,1	2,1	<1
2024	26,2	90,8	17,0	1,8	4,3	3,0	<1
2025	20,5	89,5	12,9*	0,6	100*	1,8	0

Parmi les 171 souches testées, aucune souche n'était résistante à la vancomycine (CMI > 2 mg/l), et aucune n'était résistante au métronidazole (CMI > 4 mg/l).

La répartition des CMI de la vancomycine et du métronidazole pour les 160 souches toxigènes testées est présentée sur la figure 8.

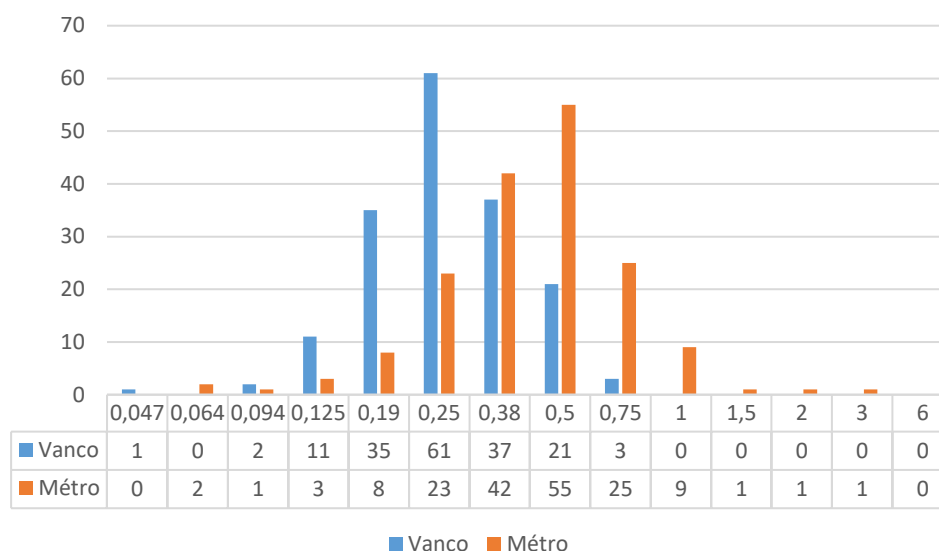


Figure 8: Répartition des CMI de vancomycine et de métronidazole pour les 160 souches toxigènes.

- Surveillance de la résistance à la fidaxomicine :

La détermination de la sensibilité des souches à la fidaxomicine par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé a été mise au point au CNR. En 2025, toutes les souches de routine ont été testées, ainsi que les souches de patients du GH AP-HP.Sorbonne Université ayant eu une récurrence d'ICD après traitement par la fidaxomicine. Une souche résistante à la fidaxomicine a été utilisée comme témoin pour les antibiogrammes. Le graphique en figure 9 montre la répartition des diamètres.

Distribution des diamètres pour le disque de fidaxomicine

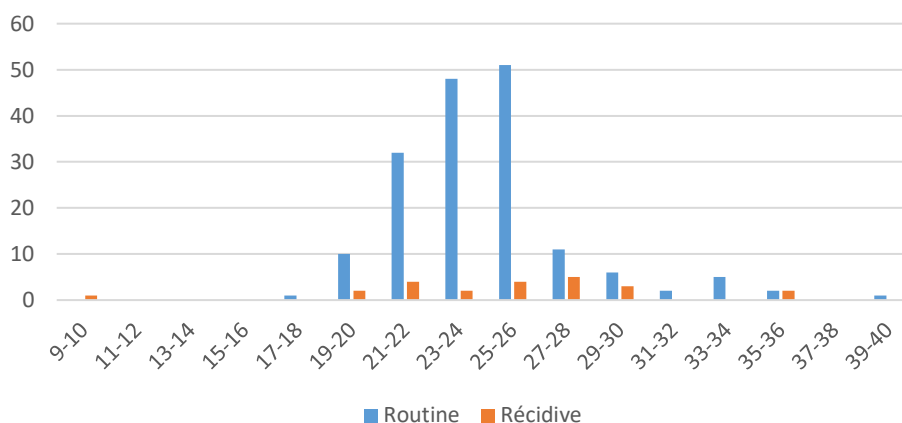


Figure 9 : Distribution des diamètres d'inhibition des souches vis-à-vis de la fidaxomicine.

Une technique de détermination des CMI en milieu liquide est en cours de mise au point au CNR. Elle permettra de déterminer le diamètre critique afin de catégoriser une souche résistante.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Laure Diancourt a établi un lien de communication rapproché avec Geneviève Buser et ses collaborateurs de la Direction des Maladies infectieuses de santé publique France en 2025. Ce lien a permis d'améliorer l'efficacité et la réactivité face aux alertes et aux foyers de botulisme français, voir plus bas : alertes. Des échanges avec SpF, les cliniciens concernés, l'ARS et éventuellement avec les Services Vétérinaires et la Direction Générale de la Santé sont établis pour chaque foyer identifié ou suspicion. Les données du CNR sont confrontées tous les ans aux déclarations obligatoires de cas de botulisme humains reçues par SpF.

D'autre part, le CNR botulisme travaille en collaboration étroite avec le LNR du botulisme aviaire dirigé par Caroline Lemaréchal. Cette collaboration a abouti à la mise en place d'un consortium européen sur le botulisme animal qui a démarré en 2026.

Depuis août 2018, à la demande des autorités de santé suisses, le CNR réalise de façon formelle le diagnostic biologique de botulisme humain pour la Suisse.

Le CNR botulisme collabore avec ses homologues européens dans le cadre du projet ImpliBoNT, ses partenaires privilégiés sont le Robert Koch Institute (RKI), le CNR Sciensano en Belgique.

Concernant le Laboratoire associé, Frédéric Barbut est membre de l'ESGCD (European Study Group on *C. difficile*) et du comité d'organisation de l'International *Clostridioides difficile* symposium (ICDS).

Frédéric Barbut est également éditeur invité du numéro spécial du Journal « Anaerobes » consacré au congrès CloSPATH 2025 et participe activement aux études réalisées sous l'égide de l'ECDC sur la surveillance des infections à *C. difficile*.

Jeanne Couturier est membre du comité d'organisation des réunions du réseau RCDF, qui comprend les différentes équipes de recherche franciliennes dont la thématique est centrée sur *C. difficile* (Institut Pasteur, Institut Micalis, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CNR, INRAe...).

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Evolution des infections à *Clostridioides difficile* en ville et à l'hôpital en France, 2015-2019 : étude CLODICIA

L'objectif de cette étude est de déterminer l'incidence des ICD prises en charge en ville et à l'hôpital de 2015 à 2019. Une étude rétrospective a été réalisée à partir des données du système national des données de santé (SNDS). Ont été inclus tous les patients âgés de plus de 18 ans ayant un diagnostic d'ICD entre le 01/01/2015 et le 31/12/2019. Les cas ont été classés selon leur lieu de prise en charge (en ville ou à l'hôpital) et leur origine (« communautaire » versus « associée aux soins »). Le diagnostic d'ICD a été établi soit par le codage PMSI (code A04.7) pour les patients pris en charge à l'hôpital soit par la recherche de toxine bactérienne (acte 0237 ou 1033 selon la NABM) associée à la dispensation de métronidazole dans les 14 jours suivant ou précédant le test biologique pour les patients pris en charge en ville. Au total, 154 964 épisodes d'ICD ont été identifiés entre 2015 et 2019, correspondant à 61,4 cas pour 100000 habitants par an en moyenne. Parmi eux, 49,4% ont été pris en charge en ville (39% d'origine communautaire et 10,4% associés aux soins), et 50,2% à l'hôpital (8,6% d'origine communautaire et 41,6% associés aux soins). L'incidence des cas pris en charge en ville a évolué de 29,0/100000 en 2015 à 34,0/100000 en 2019 tandis que celle des patients pris en charge à l'hôpital reste relativement constante (31,9/100000 en 2015 versus 29,1/100000 en 2019). Il existe des différences régionales avec une incidence plus importante en région grand Est (214 pour 100000 respectivement en ville et à l'hôpital) et en PACA (185 et 161 pour 100000 habitants respectivement). L'âge médian des cas pris en charge en ville était de 58 ans et la mortalité à un an était de 2,9% pour les cas d'origine communautaire et de 13,6 % pour les cas associés aux soins. L'âge médian des cas pris en charge à l'hôpital était de 75 ans, les mortalités intrahospitalières et dans l'année qui suit l'hospitalisation étaient respectivement de 5,2% et 13,7%. Nos résultats indiquent que la moitié des ICD est prise en charge en ville et que leur incidence a augmenté entre 2015 et 2019. Une meilleure connaissance de ce fardeau doit permettre d'améliorer la prise en charge des patients.

NUTTENS C., BARBUT F., FOUAD F., VANHEMS P., GAVAZZI G., PACCALIN M., LILLIU H., BOURGEOIS M., FIÉVEZ S., LEMAITRE M., MOÏSI J.

Estimation of the burden of *Clostridioides difficile* infection in the community and in hospitals settings in France from 2015-2019: results from a national health insurance database study (CLODICIA SNDS study)

Anaerobes, 2026, soumis

Indicateur ISIS (Projet Orchidée : Organisation d'un Réseau de Centres Hospitaliers Impliqués Dans la surveillance Epidémiologique et la réponse aux Emergences)

Evolution épidémiologique des infections à *Clostridioides difficile* en France métropolitaine, 2020-2025

L'infection à *Clostridioides difficile* (ICD) est une cause majeure de diarrhée nosocomiale, avec 124 000 cas par an en Europe et 3 % de la mortalité attribuable. En France, les données les plus récentes (2017) indiquaient une incidence de 3,1 cas pour 10 000 journées-patients, inférieure à la moyenne européenne. Cependant, aucune estimation nationale n'était disponible depuis 2017. L'étude TRACE visait à évaluer les tendances nationales de l'ICD à partir du Système national de données de santé (SNDS) français, de 2019 à 2024. Les patients âgés de 2 ans et plus, atteints d'ICD en milieu hospitalier ou ambulatoire, ont été inclus. La définition du SNDS reposait sur un algorithme adapté de l'ECDC, combinant : (1) le code CIM-10 A04.7 pour les patients hospitalisés ; (2) un test de dépistage de *C. difficile* ET une antibiothérapie ciblée contre l'ICD dans un délai de 7 jours pour les patients ambulatoires. Les diagnostics CIM-10, les codes de procédures chirurgicales pour les complications digestives d'ICD, les prescriptions d'antibiotiques et les examens microbiologiques ont permis d'estimer l'incidence annuelle, les nouveaux épisodes et les récives sur une période d'un an, avec un suivi d'un an.

Entre 2019 et 2024, 206 640 patients distincts ont présenté au moins un épisode d'ICD en France. L'incidence en milieu hospitalier est passée de 2,84/10 000 journées d'hospitalisation (JH) (n = 14 532) en 2019 à 3,53/10 000 JH (n = 16 633) en 2024. Les ICD en ambulatoire ont connu une forte augmentation, passant d'environ 8 300 cas en 2019 à 25 800 en 2024. Cette étude fournit les premières estimations nationales de l'ICD en France depuis 2017 et suggère une tendance à la hausse, tant en milieu hospitalier qu'en ville. Un outil de détection de l'ICD validé et basé sur le SNDS pourrait compléter les systèmes de surveillance existants et renforcer les capacités nationales de suivi. Les données du SNDS pourraient servir de référence pour l'évaluation des futurs indicateurs ICD du projet ORCHIDEE, générés à partir d'entrepôts de données cliniques. Si ces tendances se confirment, la contribution des bases de données médico-administratives à la surveillance de l'ICD devrait être réévaluée.

M DECALONNE, PHAM-HI MH, GABORIT C, SALPETIER C, KHANAFAER N, DANIAU C, BARBUT F, GRAMMATICO-GUILLON L. Epidemiological trends in *Clostridioides difficile* infections in France, 2019-2024: TRACE national population-based study.

ESCMID Global 2026, Munich 16-20 avril 2026 accepté (poster commenté).

4. Alertes

L'investigation d'un foyer en Bretagne a permis d'isoler des souches de *C. botulinum* de type B et D (le type D étant non pathogène chez l'homme, il s'agit d'un pathogène uniquement vétérinaire) dans des tortillas industrielles fabriquées en Espagne et commercialisées dans de nombreux pays européens. Ce foyer a été à l'origine de 2 cas humains confirmés en France. En collaboration avec ses partenaires européens, le CNR botulisme a ainsi pu mettre en évidence l'existence d'autres cas liés au même produit industriel en Italie et en Norvège en 2023 et en Espagne en 2025. Un total de 45 échantillons (humains et alimentaires) ont été analysés au CNR dans le cadre de l'investigation autour de ce foyer et de très nombreux produits ont été retirés du marché. Les autres investigations de foyers sont détaillées dans le tableau 11 ci-dessous.

Le CNR a permis la confirmation d'un diagnostic de botulisme humain causé par une souche de *Clostridium baratii* en Belgique, en support au CNR belge Sciensano. Le CNR a également été sollicité par la Lituanie pour la confirmation de diagnostic d'un botulisme de type E chez deux patients et l'isolement de la souche responsable dans l'aliment contaminé (poisson séché). Enfin le CNR a permis le diagnostic de botulisme lors d'une épidémie d'envergure à Madagascar (total de 17 personnes décédées).

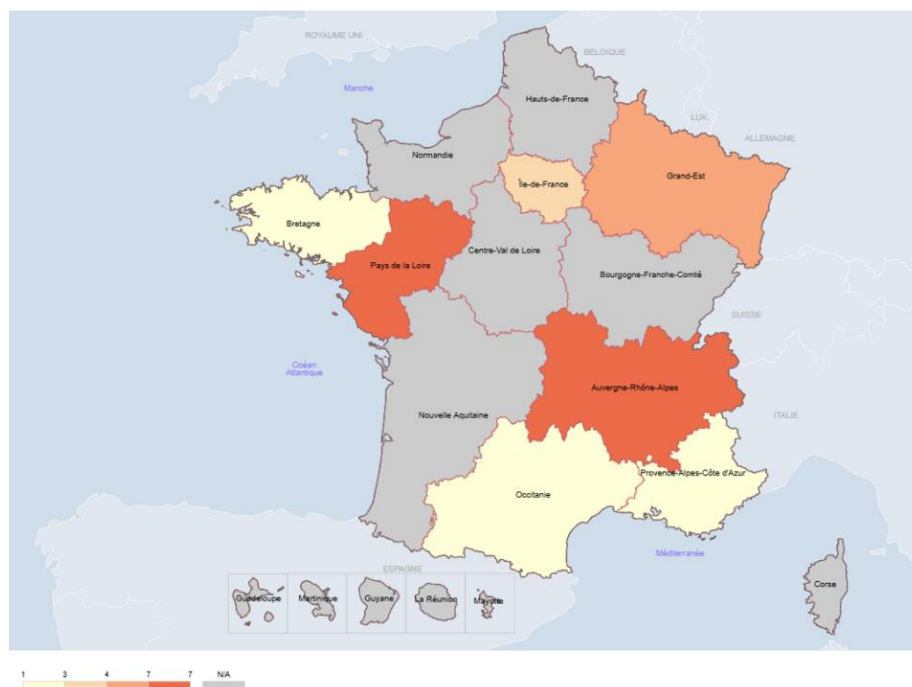


Figure 10: Répartition géographique des foyers de botulisme en France en 2025.

Tableau 11: Synthèse des éléments clefs concernant les foyers de botulisme humain alimentaire investigués en 2025 par le CNR

Région(s) (domiciles des patients)	Nombre de cas	Souche isolée chez le patient	Souche isolée dans l'aliment	Aliment incriminé
Hauts de France, Grand Est	2	Type A5	Type A5	Courgettes (conserves artisanales)
Auvergne-Rhône Alpes	1	Non	Type B2	Pâté miel artisanal
Grand Est	1 confirmé, 1 probable	Diagnostic sur sérum type B	Non	Aucun aliment reçu, consommation jambon cru ferme locale
Pays de la Loire	7 dont 1 décès	Type B2	Non	Conserve de carottes
Ile de France	2	Type B2	Non	Plats tunisiens
Ile de France	1	Non	Type B2	Plat de lentilles-carottes maison
Bretagne	2 confirmés	Diagnostic sur sérum type B	Type B4 et type D ou D/C (pathogène vétérinaire) dans d'autres produits du même type	Tortillas industrielles
Auvergne-Rhône Alpes	2	Type B	Type B	Jambon cru artisanal
Occitanie	1	Type B	Non	Thon en boîte
Auvergne-Rhône Alpes (Lyon)	4	Souche non isolée, prélèvements réalisés très tardivement, diagnostic non confirmé mais très probable		Conserve de haricots verts maison
PACA et Grand Est	2	Type Bf	Non	Conserves de champignons maison
Belgique	2	Diagnostic par PCR sur ADN extraits de selles Type F7	Non	Consommation de jambon et fromage
Lituanie	2	Diagnostic sur sérum type E	Type E	Poisson séché
Madagascar	17 décès, nombre total de cas inconnu	Diagnostic sur sérum : toxine de type E	<i>C. butyricum</i> non toxigène isolé, PCR type E positive sur l'aliment	Macédoine

La surveillance des infections à *C. difficile* en France repose sur le signalement aux autorités sanitaires (ARS et CPIas) des épidémies et des cas sévères d'infections (http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/). Il s'agit d'une surveillance ciblée. Les établissements réalisant un signalement doivent envoyer au laboratoire associé les souches isolées de l'épisode signalé afin d'assurer la surveillance de l'éventuelle dissémination du clone épidémique 027 sur le territoire français ainsi que celle d'autres clones émergents. Les données de typage sont accessibles en temps réel au responsable de l'Unité Infections Nosocomiales de Santé Publique France. De plus chaque responsable des CPIas a accès aux informations concernant sa région. L'émergence du clone 027 ou de tout autre clone dans une région sera rapidement remarquée.

L'année 2025 a été marquée par la surveillance du clone épidémique 638 qui avait émergé en 2022. Ce clone a été à l'origine de cas groupés d'infections à *C. difficile* dans plusieurs établissements de santé depuis 2019.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Conseils aux cliniciens et aux biologistes par téléphone ou par mail auprès des responsables du CNR et de son laboratoire associé. Fréquence au minimum de 2-3 appels par semaine pour chaque type d'expertise (Botulisme, *C. difficile*, autres anaérobies). Les numéros directs du CNR et de son laboratoire associé, ainsi que les adresses mails permettant de joindre les responsables directement sont disponibles sur la page web du CNR : [Centre national de référence des Bactéries anaérobies et du botulisme - Institut Pasteur](#).

L. Diancourt a réalisé une présentation sur les méthodes de diagnostic du botulisme au CNR dans le cadre de l'investigation du foyer de botulisme de Quimper (ARS de Bretagne) en octobre 2025.

L. Diancourt a réalisé une présentation en RCP médicale à l'hôpital du Kremlin Bicêtre (APHP) autour d'un cas de botulisme iatrogène en octobre 2025.

F. Barbut a été membre du Comité d'organisation de l'International *C. difficile* symposium 2025 (Bled Slovénie).

F. Barbut est éditeur invité du numéro spécial du Journal « Anaerobes » consacré au congrès Clospath 2025 (IPP, septembre 2025).

- **Stagiaires accueillis 2024-2025**

Organisme Nom de l'Etudiant	Diplôme / Sujet	Année
Thèse d'Université en co-tutelle Anais Lemaire	Doctorat de sciences <i>Clostridioides difficile</i> chez les Equidés : rôle du portage asymptomatique et des biofilms dans la persistance des infections et le potentiel zoonotique	2021-2025
Thèse d'Université Adriana Badillo	Doctorat de sciences Caractérisation d'une famille de petites protéines régulées par des riboswitchs répondant à des seconds messagers chez <i>Clostridioides difficile</i>	2021-2025
DU « Création, analyse et valorisation de données omiques » Jeanne Couturier	Mémoire de DU : « Apport de la génomique dans l'étude de la transmission de <i>C. difficile</i> »	2024-2025
DU « Création, analyse et valorisation de données omiques » Muriel Ehmig	Mémoire de DU : « Investigation de l'émergence nationale du clone RT638 »	2024-2025
Thèse d'Université Alexandre Mrozinski	Etudiant en thèse d'Université (stage)	2025

- **Liste des guides élaborés :**

F. BARBUT, L. DUBREUIL, C. ALAUZET, H. MARCHANDIN: Bactéries anaérobies à Gram positif - EMC Biologie, 2025

C. ECKERT, H. MARCHANDIN, V. LALANDE, F. BARBUT: *Clostridioides difficile* - EMC Biologie, 2024

- **Communications en congrès :**

F. BARBUT: Gut microbiota and CDI treatment: what do we know? 35th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 11-15 avril 2025, Vienne, Autriche

F. BARBUT: Host response to *Clostridioides difficile* : hit or mist ? 36th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 17-21 avril 2026, Munich, Allemagne

- **Informations disponibles sur :**

Site web RAISIN et de Santé Publique France : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Clostridium-difficile-CD>

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Laure Diancourt, Frédéric Barbut, Jeanne Couturier et Imane Mostaghat sont en contact étroit avec Santé Publique France pour l'interprétation de situations épidémiologiques.

F. Barbut a participé aux groupes de travail sur la transplantation fécale pilotés par l'ANSM d'une part et l'Académie de Pharmacie d'autre part. Il est membre du GFTF (Groupe Français de Transplantation Fécale), groupe dirigé par Harry Sokol et créé en 2016. Il est membre du premier Centre de Transplantation de Microbiote Fécal qui s'est créé à l'hôpital Saint-Antoine sous la responsabilité du Pr Harry Sokol.

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

Non applicable en 2025.

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

Comparative evaluation of the Standard M10 and Xpert *C. difficile* assays for the detection of toxigenic *Clostridioides difficile* in stools

Objectives: This study aims to compare the sensitivity and specificity of two Nucleic Acid Amplification Tests (NAAT), the STANDARD M10 *C. difficile* (M10) and the Xpert *C. difficile* (Xpert) assays, for the detection of toxigenic *C. difficile* strains in stools.

Material and Methods: This prospective study included fresh diarrheal stools. Following routine testing by the *C. diff.* Quik Chek complete enzyme immunoassay (EIA), M10 and Xpert were tested in parallel alongside with toxigenic culture (gold standard) on selective chromogenic medium (ChromID *C. difficile*). The M10 and Xpert assays were performed by independent technicians. We also compared the results of the M10 assay from 10 native stools and fecal swab paired samples.

Results: 541 stool samples were included. The toxigenic culture was positive for 60 stool specimens (11.0%), including 32 free toxins positive stools. Both M10 and Xpert demonstrated comparable sensitivity (100%) and specificity (97.5%). The *tcdB* cycle threshold (Ct) values obtained with the M10 and Xpert assays were highly correlated (Pearson correlation coefficient: 0.909, $p < 0.001$). The median *tcdB* Ct values for toxin EIA-positive/NAAT positive specimens were significantly lower than those for toxin EIA-negative/NAAT positive specimens in both M10 (25.50 vs 32.39) and Xpert assays (23.70 vs 31.15) ($p < 0.001$). Receiver operating characteristic curve analysis, assessing the ability of Ct values to predict the detection of free toxins, exhibited an area under the curve of 0.875 for M10 and 0.862 for Xpert. The use of 400 μ L of fecal swab transport medium yielded Ct values closer than 100 μ L or 200 μ L to those from native stools.

Conclusion: The M10 *C. difficile* assay displays a high sensitivity and specificity and is comparable to Xpert assay.

ROUKOZ-DIAB Y, EHMIG M, LUCE S, ECKERT C, TIMSIT S, MOSTAGHAT I, COUTURIER J, BARBUT F

Comparative evaluation of the Standard M10 and Xpert *C. difficile* assays for the detection of toxigenic *Clostridioides difficile* in stools

Microbiology Spectrum 2026, sous presse.

Phenotypic and genomic characterization of *Clostridioides difficile* strains involved in multiple recurrences

Background: Multiples relapses of *Clostridioides difficile* infection (rCDI) are frequent, and. They impact patient's quality of life and are difficult to treat. They are linked either to patient's conditions (immunity, intestinal dysbiosis), or potentially to the strain's characteristics.

Aim: To determine the genomic and phenotypic characteristics of *C. difficile* strains that have caused recurrent CDIs (rCDI).

Materials and methods: Between 2019 and 2022, 10 CD strains responsible for multiple relapses (≥ 2 relapses) were selected and matched on their PCR-ribotype to 10 CD control strains. The 20 genomes were sequenced and analysed (resistome, virulome, mobile genetic elements). The phenotypic characteristics (stress resistance (H₂O₂), motility, hydrophobicity, sporulation, germination, biofilm, susceptibility to bile acids) of relapse strains and controls were compared.

Results: We did not show any significant genomic or phenotypic differences between the strains involved in multiple relapses and control strains, apart from the susceptibility to deoxycholate 0,03%, which was higher in strains from relapses compared to controls. However, all these tests indicated an important phenotypic and genomic variability across the strains.

Conclusion: The origin of rCDI does not seem to be directly linked to characteristics of the CD strain, suggesting that these relapses are more related to host factors such as intestinal dysbiosis or patient's immune status.

LECOUTOUR A., MESA V., COUTURIER J., DELANNOY J., PIGNEUR B., BARBUT F.

Phenotypic and genomic characterization of *Clostridioides difficile* strains involved in multiple recurrences.

8th International symposium on *Clostridioides difficile* (ICDS)

Anaerobe. 2025 Aug;94:102980. doi: 10.1016/j.anaerobe.2025.102980. Epub 2025 Jun 25.

Infections à *Clostridioides difficile*: quelle conformité des prescriptions d'anti-infectieux ?

Introduction: En décembre 2021, l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) a actualisé les recommandations concernant le traitement des infections à *Clostridioides difficile* (ICD). Ces recommandations ont été validées par la Société de Pathologies infectieuses de langue française et diffusées par la Commission des médicaments anti-infectieux de l'AP-HP et de notre hôpital. L'objectif de ce travail était de déterminer la conformité des prescriptions, dans notre hôpital, pour traiter les ICD.

Matériels et méthodes: Les caractéristiques clinico-biologiques et les traitements des patients ayant une ICD (test immuno-chromatographique ou PCR positifs pour les toxines) ont été recueillies entre juin 2022 et juin 2023 grâce au dossier patient informatisé. La conformité des prescriptions a été étudiée selon la sévérité de l'infection (forme simple, sévère non compliquée, sévère compliquée), le risque de récurrence (âge > 65 ans, ou traitement concomitant par inhibiteur de pompe à proton et/ou antibiotique, ou antécédent d'ICD), et s'il s'agissait d'un 1er épisode ou d'une récurrence. Le traitement était considéré comme conforme (molécule et posologie adéquates), NC (molécule inadéquate) ou partiellement conforme (posologie ou durée inadéquate, par exemple). En cas de changement d'une molécule NC pour une conforme, dans les 3 jours, la conformité était considérée comme partielle.

Résultats: Au total, 130 cas d'ICD (88% d'épisodes initiaux et 12% de récurrences) ont été inclus. La moyenne d'âge était de 65,5 ans avec un ratio homme/femme de 0.9. Parmi les cas, 72% étaient nosocomiaux (> 48 heures), 97% avaient au moins un facteur de risque de récurrences, 50% étaient des formes simples, 25% des formes sévères non compliquées, 25% des formes sévères compliquées. Au total, 122 cas ont été traités : 39% des traitements ont été considérés comme conformes, 43% étaient NC et 12% étaient partiellement conformes. Dans 96% des cas de NC, la vancomycine était prescrite alors que la fidaxomicine était attendue. Aucun patient de la cohorte n'a été traité par métronidazole oral.

Conclusion: Après 6 mois d'appropriation, les nouvelles recommandations de l'ESCMID semblent connues des cliniciens de notre hôpital, si l'on en juge par l'absence d'utilisation de métronidazole per os et l'utilisation fréquente de la fidaxomicine.

JOUANS C., STORDEUR .F, FERREIRA C, BARBUT F. Infections à *Clostridioides difficile* : Quelle conformité des prescriptions d'anti-infectieux ?

HYGIÈNES • 2025 - VOLUME XXXIII - N° 3

Detection and characterization of *Clostridioides difficile* in broiler slaughterhouses

Introduction- Materials and methods : *Clostridioides difficile* is a major human pathogen causing mild-to-severe colitis worldwide. Food has been suspected to be a significant source of transmission of *C. difficile*, in particular meat and meat-products. The objective of this study was to bring an overview of the detection and characteristics of *C. difficile* at the slaughterhouse level in pig, cattle and poultry sectors in France covering the entire production process.

Results: A total of 1871 samples were collected and analyzed from three slaughterhouses per animal sector. *C. difficile* was not detected in any samples collected in cattle slaughterhouses but it was detected in 1% and 6% of the samples in pig and poultry slaughterhouses, respectively. In pig slaughterhouses, *C. difficile* was detected in 5 fecal samples and 1 environmental sample in the slaughter area. In poultry slaughterhouses, the highest contaminated samples were the scalding (58.3%), plucker machines (45.8%) and transport crates (33.3%). No *C. difficile* was isolated from meat or samples collected in the cutting area except one environmental sample in one poultry cutting area. A large diversity of PCR-ribotypes was observed with 25 different PCR-Ribotypes (4 different ones in pig samples and 21 different ones in poultry samples) and 10 poultry samples were contaminated with several PCR-Ribotypes. RT002 and 014, frequently detected in human infections were the most common ones here. In addition, most 92.4% of the isolates harbored *tcdA* and *tcdB* genes (21 RT). Cg-MLST comparison of the isolates showed the absence of persistence among visits. All isolates were susceptible to vancomycin, metronidazole, moxifloxacin and rifampicin and the main detected resistance was detected against clindamycin (98%).

Conclusion: This study reveals a low contamination by *C. difficile* at the slaughterhouse stage, mainly limited to the first steps of the process.

C. LE MARECHAL , M.EHMIG , T. POEZEVARA , C.A TRAN , C.MALAYRAT, T. COADOU, L. JAMBOU, S. ROUXEL, L.DIANCOURT, S. LE BOUQUIN, A. HUNEAU-SALAÜN, R. THOMAS, C. LOPEZ-RIZO, A. LE ROUX, B. HOURY, C. BIECHETTERIER, P. LEDORMAND , C.FEURER, O.FIRMESSE, F. BARBUT. Detection frequency and characterization of *Clostridioides difficile* from French slaughterhouses in the pig, cattle and poultry sectors.

Food Microbiol., 2026 soumis

Direction de thèse de sciences (Adriana BADILLA LOBO) avec le Dr Johann PELTIER (I2BC UMR 9198 Université Paris-Saclay, Rue Gregor Mendel, Bât 400 - 91405 Orsay) sur « Caractérisation d'une famille de petites protéines régulée par des riboswitches répondant à des seconds messagers chez *Clostridioides difficile* »

La physiopathologie de *C. difficile* est régie par des réseaux de régulation complexes, incluant des mécanismes basés sur l'ARN tels que les riboswitches. Les riboswitches, situés dans la région 5' non traduite des ARNm, se lient à des ligands spécifiques, induisant des changements de conformation qui modulent l'expression du gène en aval. Chez *C. difficile*, 16 riboswitches répondent à la molécule de signalisation c-di-GMP. Le c-di-GMP est un régulateur contrôlant la transition d'un mode de vie planctonique libre à un mode de vie sessile associé à la régulation des facteurs de virulence. Plusieurs riboswitches à c-di-GMP régulent des gènes impliqués dans la formation des flagelles, l'assemblage des pili de type IV, le développement du biofilm, l'adhésion et la production de facteurs de virulence tels que les toxines chez *C. difficile*. De plus, le c-di-GMP inhibe la sporulation chez *C. difficile*, mais le mécanisme sous-jacent n'est pas connu.

Nous avons caractérisé ici des riboswitches à c-di-GMP qui n'ont pas encore été étudiés. Nos analyses bioinformatiques ont révélé que 5 d'entre eux sont situés directement en amont de gènes codant des petites protéines (PPs) de 58 acides aminés (AA). De manière intéressante, un alignement de ces 5 protéines a montré qu'elles sont presque identiques en séquence. De plus, une recherche d'homologie a permis de découvrir 2 protéines supplémentaires de 60 AA, très similaires aux cinq premières, bien que leurs gènes ne soient pas précédés d'un riboswitch. Cette nouvelle famille de protéines est conservée dans toutes les souches de *C. difficile*, mais n'a pas d'homologues en dehors de l'espèce. Nous avons construit une version étiquetée d'une PP et l'avons détectée par immunoblotting de fractions cellulaires, confirmant sa nature protéique et révélant qu'elle est associée à la membrane. Des données de séquençage de l'ARN (RNA-seq) ont démontré que le c-di-GMP régule négativement l'expression des 5 gènes de PP en aval des riboswitches ainsi que des 2 gènes supplémentaires. Nous avons également observé que le c-di-AMP, un autre dinucléotide cyclique impliqué dans l'osmorégulation, réprime l'expression des 7 gènes. Des expériences de fusions transcriptionnelles entre la région promotrice d'une PP et un gène rapporteur ont confirmé que le c-di-GMP nécessite le riboswitch pour moduler l'expression des gènes en aval. En revanche, le c-di-AMP régule leur expression indépendamment du riboswitch en modulant l'activité du promoteur. Ainsi, le c-di-GMP et le c-di-AMP influencent l'expression des PP par des mécanismes distincts.

Pour étudier le rôle des PP chez *C. difficile*, nous avons surexprimé l'une d'elles et comparé son transcriptome à celui de la souche sauvage. Cela a révélé l'induction de l'expression de plus de 100 gènes impliqués dans la sporulation dans la souche surexprimant la PP. Conformément à ces données, la surexpression de cette PP a conduit à un phénotype d'hypersporulation. En outre, la délétion des 7 gènes de PP (mutant $\Delta 7$) a entraîné une réduction de la sporulation, avec des phénotypes intermédiaires pour les souches où seuls certains gènes des PP ont été délétés. Le défaut de sporulation de $\Delta 7$ est similaire à celui d'une souche produisant des niveaux élevés de c-di-GMP, suggérant que l'impact du c-di-GMP sur la sporulation pourrait être médié par la régulation des PP. Pour tester cette hypothèse, nous avons créé un mutant $\Delta 7$ produisant de fortes concentrations de c-di-GMP. Le défaut de sporulation de cette

souche était équivalent à celui du mutant $\Delta 7$ non affecté dans sa production de c-di-GMP, indiquant que les effets des délétions des PP et de la surproduction de c-di-GMP ne sont pas cumulatifs.

Dans l'ensemble, nos résultats démontrent que cette nouvelle famille de petites protéines est régulée à la fois par le c-di-GMP et le c-di-AMP et joue un rôle clé dans le contrôle de la sporulation chez *C. difficile*.

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

Publications Nationales 2024-2025

COUTURIER J, ROMANO-BERTRAND S, POZZETTO B, BARBUT F, DECOUSSER JW. : Diagnostic et prise en charge des diarrhées à *Clostridioides difficile* - Hygiènes 2024, XXXII, 1, 61-69

COUTURIER J, EHMIG M, FILLION M, BARBUT F.: En direct du... Centre National de Référence (CNR) *Clostridioides difficile* - Hygiènes 2024, XXXI, 1, 72-74

BARBUT F, ECKERT C., LALANDE V., LE NEINDRE K., et COUTURIER J. : Infections digestives à *Clostridioides difficile* - Revue du praticien Médecine générale, 2024, 38.

COUTURIER J., EHMIG M., MOSTAGHAT I., BARBUT F.: Diagnostic biologique de l'infection à *Clostridioides difficile* Ann. Biol. Clin 2024, 82, 611-617.

DENIS M, BONIFAIT L., BARBUT F, HOURY B, QUESNE SEGOLÈNE, NAGARD B., BAUGE L., EHMIG M., CHEMALY M., LE MARECHAL C.: Contamination des viandes fraîches de volailles par *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, et *C. difficile* au stade de la distribution, plan de surveillance 23022. Bulletin épidémiologique santé animale -alimentation, 2024, 102, 4.

COUTURIER J, MOSTAGHAT I, BARBUT F.: Risque d'infection à *Clostridioides difficile* : peut-on agir par le microbiote ? - Hygiènes, 2025, vol. 33, 2

JOUANS C., STORDEUR F, FERREIRA C., BARBUT F. : Infections à *Clostridioides difficile* : Quelle conformité des prescriptions d'anti-infectieux ? - Hygiènes, 2025, vol 33, 3.

Publications Internationales 2025-2026

2025

BENECH N, CASSIR N, ALRIC L, BARBUT F, BATISTA R, BLEIBTREU A, BRIOT T, DAVIDO B, GALPERINE T, JOLY AC, KAPEL N, MELCHIOR C, MOSCA A, NEBBAD B, PIGNEUR B, SCHNEIDER SM, WASIAK M, SCANZI J, SOKOL H; French Faecal Transplant Group (GFTF). Impact of Clinical and Pharmacological Parameters on Faecal Microbiota Transplantation Outcome in *Clostridioides difficile* Infections: Results of a 5-Year French National Survey. - Aliment Pharmacol Ther. 2025 Jan;61(1):159-167. doi: 10.1111/apt.18330. Epub 2024 Oct 10. PMID: 39387234

MENA CASERO MV, TURNER AD, BEN-GIGIREY B, ALEXANDER RP, DEAN KJ, HATFIELD RG, MASKREY BH, MAZUET C, KARAMENDIN K, MATEO R. Identifying Causative Agents of a Paretic Syndrome in Waterbirds in Southern Portugal. Toxins (Basel). 2025 Jan;17(2):62. doi: 10.3390/toxins17020062. PMCID: PMC11860645.

DELVALLEZ G, DIANCOURT L, GUGLIELMINI J, MICHON AL, BRISSE S, DUPUY B, CRISCUOLO A. Comment on: Co-occurrence of the Cephalosporinase cepA and Carbapenemase cfiA Genes in a *Bacteroides fragilis* Division II Strain: An Unexpected Finding. J Antimicrob Chemother. 2025 Feb;80(2):598-600. doi: 10.1093/jac/dkae427. PMID: 39657152.

DELVALLEZ G, DIANCOURT L, GERMON J, CAMPAGNE P, DUPUY B. Comparison of Disc Diffusion and Sensititre® Broth Microdilution Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Bacteroides fragilis* Group Clinical Isolates Following the French Guidelines. Anaerobe. 2025 Jun;93:102969. doi: 10.1016/j.anaerobe.2025.102969. PMID: 40339735.

BARBUT F, MOSTAGHAT I, EHMIG M, ROUKOZ-DIAB Y, COUTURIER J. Laboratory diagnosis of *Clostridioides difficile* infection: past, present and future. Anaerobe. 2025 Jun;93:102974. doi: 10.1016/j.anaerobe.2025.102974. Epub 2025 May 23. PMID: 40412504 Review.

TOUBON G, PATIN C, DELANNOY J, ROZÉ J-C, BARBUT F, ANCEL P-Y, CHARLES M-A, BUTEL M-J, LEPAGE P, AIRES J. Very preterm gut microbiota development from the first week of life to 3.5 years of age: a prospective longitudinal multicenter study. Microbiol Spectr. 2025 Apr;13(4):e0163624. doi: 10.1128/spectrum.01636-24. Epub 2025 Feb 19. PMID: 39969235 Free PMC article.

LECOUTOUR A, MESA V, COUTURIER J, DELANNOY J, PIGNEUR B, BARBUT F. Phenotypic and genomic characterization of *Clostridioides difficile* strains involved in multiple recurrences. Anaerobe. 2025 Aug;94:102980. doi: 10.1016/j.anaerobe.2025.102980. Epub 2025 Jun 25. PMID: 40578753

DELANNOY J, FERRARIS L, LABELLIE C, DUPIRE L, ILAVSKA D, BUTEL MJ, BARBUT F, AIRES J. Commensal Clostridia in the preterm gut as reservoirs of antimicrobial resistance: susceptibility profiles, and resistance genes. FEMS Microbiol Ecol. 2025 Dec 22;102(1):fiaf122. doi: 10.1093/femsec/fiaf122. PMID: 41347891

CASSIR N, MESA V, FERRARIS L, DELANNOY J, MIKRAT Y, ADJAMIAN A, DIANCOURT L, MAZUET C, BARBUT F, LA SCOLA B, AIRES J. Whole-Genome Sequencing-Based Typing Methods for *Clostridium butyricum* Strains from Clinical,

Animal, Plant, and Environmental Sources. Microbiol Spectr. 2025 Dec 12;14(2):e02619-25. doi: 10.1128/spectrum.02619-25. PMID: 41384747.

2026

BAILLIEU V, DELANNOY J, KAPEL N, BARBUT F, MOSCA A, JOLY AC, WALIGORA-DUPRIET AJ, SINTES R Evaluation of the efficacy of inactivated fecal transplants against *Clostridioides difficile*: an in vitro study" World J Microbiol Biotechnol. 2026 Jan 29;42(2):66. doi: 10.1007/s11274-025-04767-z.

DELVALLEZ G, CAMPAGNE P, ALAUZET C, DIANCOURT L, BARBUT F, MARCHANDIN H, DUPUY B; BFG AMR COLLABORATIVE STUDY GROUP. Antimicrobial resistance in the *Bacteroides fragilis* group: national multicenter survey and Bayesian modelling study, France, 2022-2023. J Glob Antimicrob Resist. 2026 Jan 12:S2213-7165(26)00003-2. doi: 10.1016/j.jgar.2026.01.003. Online ahead of print. PMID: 41534775

PETRY S., TAPPREST J., MAILLARD K., BARBUT F, DUQUESNE F., KOZAK S., FOUCHER N. BERNEZ-ROMAND M., BRIDOUX L., POQUET I. *Clostridioides difficile* in Equidae necropsied in Normandie, 1 France, in 2019-2021: common carriage of toxigenic strains and virulence of emerging ribotype 017 Microbiol. Spectrum 2026, Dec 30:e0216525

ROUKOZ-DIAB Y., EHMIG M., LUCE S., ECKERT C., TIMSIT S., COUTURIER J., MOSTAGHAT I., BARBUT F. Evaluation of the STANDARD M10 and Xpert C. *difficile* assays for the detection of toxigenic *Clostridioides difficile* in stools. Microbial Spectrum 2026, sous presse

Publications en cours de révision ou soumises

NUTTENS C., BARBUT F., FOUAD F., VANHEMS P., GAVAZZI G., PACCALIN M., LILLIU H., BOURGEOIS M., FIÉVEZ S., LEMAITRE M., MOÏSI J. Estimation of the burden of *Clostridioides difficile* infection in the community and in hospitals settings in France from 2015-2019: results from a national health insurance database study (CLODICIA SNDS study). Anaerobe, 2026 soumis

LEMAIRE A., BRIDOUX L., COSTACHE V., DUPUY B, BARBUT F., PETRY S., POQUET S. In vitro biofilms of *Clostridioides difficile* undomesticated strains: morphology and properties according to strain diversity. NPJ Biofilm Microbiome 2026, soumis

KOTILA S., BARBUT F., BERGER F., TOTH A., HADJU A., HAJBEL-VEKONY G., PERSSON S., KRUTOVA M., BAKTASH A., KUIJPER E., PERRY M., MORRIS T., MENTULA S., KINROSS P. on behalf of ECDC CDI WGS group Multi-country, whole genome sequencing-based clusters of *Clostridioides difficile* infection cases with RT176 and related strains, in European healthcare centres, 2006-2020 Eurosurveillance 2026, soumis.

MUZYUKINA P., KIRILLOV B., STEPANOV A., BARBUT F., SEVERINOV K., SOUTOURINA O. Sensitive high resolution CRISPR-based typing for epidemiology and microevolution survey of the human pathogen *Clostridioides difficile* with multi-task deep learning. In preparation

MROZINSKI A., MARTAK D, REBOUL G, EHMIG M, DIANCOURT L, BARBUT F, LE MARÉCHAL C, TOPP E. Comparative evaluation of three high-molecular-weight DNA extraction kits for Oxford Nanopore sequencing of *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens* Microbial genomics, in preparation

LEMAIRE A, MESA-SCHEIN V, BRIDOUX L, LE HELLO S, LÉMÉE L, PETRY S, BARBUT F, POQUET I. Genome wide analysis of *Clostridioides difficile* diversity and spread between equids and humans in northwestern France from 2018 to 2021. In preparation

Articles didactiques

COUTURIER J, EHMIG M, MOSTAGHAT I, BARBUT F. *Clostridioides difficile* infection diagnosis. Ann Biol Clin (Paris). 2025 Feb 4;82(6):609-617. doi: 10.1684/abc.2024.1927. PMID: 39749622 Review.

Communications nationales

ROUKOZ DIAB Y, EHMIG M, LUCE S, ECKERT C, TIMSIT S, COUTURIER J, MOSTAGHAT I, BARBUT F. Evaluation comparative des tests STANDARD™ M10 et Xpert® *C.difficile* pour la détection de *Clostridioides difficile* toxigène dans les selles". 44ème RICAI, 15-16 décembre 2025.

BADILLA LOBO A., SOUTOURINA O., BARBUT F, PELTIER J. A newly identified family of c-di-GMP-regulated small proteins controls sporulation in *Clostridioides difficile*. ClosthPath2025, Paris 1-4 septembre 2025

DELANNOY J., FERRARIS L., BARBUT F, AIRES J. Comparison of antibiotic susceptibility and genetic determinants of rarely studied *Clostridia* strains isolated from fecal samples of infants ClosthPath2025, Paris 1-4 septembre 2025

LE MARECHAL C., EHMIG M., POZEVARA T., JAMBOU L., THOMAS R., ROUXEL S., MARTINS L., LE BOUQUIN, HUNEAU-SALAÜN A., COUTURIER J., HOURS B., ROUKOZ DIAB Y., MARAULT M., KOOH P., LUCE S., CHEMALY M., FIRMESSE O., BARBUT F. Overview of *Clostridioides difficile* in the poultry sector in France. ClosthPath2025, Paris 1-4 septembre 2025

PETRY S., TAPPREST J., MAILLARD K., BARBUT F., DUQUESNE F., KOZAK S., FOUCHER N., BERNEZ-ROMAND M., BRIDOUX L., POQUET. I. *Clostridioides difficile* in Equidae necropsied in north-western France, in 2019-2021: common carriage of toxigenic strains and virulence of emerging ribotype 017. ClosthPath2025, Paris 1-4 septembre 2025

LE MARÉCHAL C., EHMIG M., POZEVARA T., JAMBOU L., THOMAS R., ROUXEL S., MARTIN L., LE BOUQUIN S., HUNEAU A., COUTURIER J., HOURS B., MA L., MARAULT M., KOOH P., FILLION M., CHEMALY M., FIRMESSE O., BARBUT F. Overview of *Clostridioides difficile* in the poultry sector in France ClostPath 2025, Paris, France, 1-4 September 2025

VAN NIEUWENHUYSEN T., LINUSSIO J., NENDUMBA G., POTVIN M., MARTINAGE M., RUBIGIRI L., MONTESINOS I., VODOLOSKAIA A., MUKOVNOKOVA M., DIANCOURT L., DORNER M., DECKERS C., MICHAUX I. First reported case of type F botulism in Belgium. ClosthPath2025, Paris 1-4 septembre 2025

CASSIR N., MESA V., FERRARIS L., DELANNOY J., MIKRAT Y., ADJAMIAN A., DIANCOURT L., MAZUET C., BARBUT F., LA SCOLA B., AIRES J. Whole-genome sequencing based typing methods of clinical *Clostridium butyricum* strains isolated in different spatio-temporal settings. ClosthPath2025, Paris 1-4 septembre 2025

LE MARÉCHAL C., HUNEAU-SALAÜN A., POZEVARA T., JAMBOU L., THOMAS R., ROUXEL S., EHMIG M., TRAN C., COUTURIER J., MA L., ANLYATA Y., FILLION M., CHEMALY M., LE BOUQUIN S. , BARBUT F., FIRMESSE O. Suivi de

Clostridioides difficile et *Clostridium perfringens* à l'abattoir. Journée Avicole et Cunicole d'Information et d'Echanges de l'Anses, Ploufragan, France, 20 novembre 2025 présentation orale

POEZEVARA T., HUNEAU-SALAÜN A., JAMBOU L., THOMAS R., ROUXEL S., EHMIG M., CHRISTINA T., COUTURIER J., MA L., YOUSSEF A., FILLION M., CHEMALY M., GUYARD M., LE BOUQUIN S., BARBUT F., FIRMESSE O., LE MARÉCHAL C. *Clostridium perfringens* et *Clostridioides difficile* dans la filière avicole, quel danger en abattoir 16èmes Journées de la recherche avicole et palmipèdes à foie gras, Tours, France, 18 & 19 mars 2026 présentation orale

Communication internationale

ROUKOZ-DIAB Y., EHMIG M., LUCE S., ECKERT C., TIMSIT S., MOSTAGHAT I., COUTURIER J., BARBUT F. Comparative evaluation of the Standard M10 and Xpert *C. difficile* assays for the detection of toxigenic *Clostridioides difficile* in stools. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - ESCMID Global 2025, Poster 11-15 avril 2025, Vienne.

Conférence sur invitation

BARBUT F., Gut microbiota and CDI treatment: what do we know? 35th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 11-15 avril 2025, Vienne, Autriche.

BARBUT F., Host response to *Clostridioides difficile*: hit or miss? 35th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 17-21 Avril 2026, Munich, Allemagne

BARBUT F., Actualités sur *Clostridioides difficile*. 1ère édition des journées sur les infections digestives, hépatiques et bilio-pancréatiques. Hôpital Beaujon, 23 mai 2025

BARBUT F., Structure des populations de *C. difficile* en abattoirs : présence, diversité et virulence. Séminaire de clôture de l'ANR du 13 novembre 2025 , Maison Alfort

BARBUT F., *Clostridioides difficile* : des hôpitaux à nos assiettes. Séminaire de clôture de l'ANR du 13 novembre 2025, Maison Alfort

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

Une collaboration avec l'unité SBCL (*Staphylococcus*, *Bacillus* & *Clostridium*) du laboratoire de sécurité des Aliments de l'ANSES-Maison Alfort est également en place avec le CNR autour des sujets suivants investigation de TIAC à *Clostridium perfringens* et/ou *Bacillus cereus* pour confronter, comparer et analyser les souches isolées des aliments contaminés et celles isolées des prélèvements biologiques des victimes.

Une collaboration active et efficace est en place avec le Laboratoire National de Référence (LNR) (ANSES Ploufragan) qui participe au diagnostic et à la surveillance du botulisme animal en France, et en particulier aviaire :

- 1) Pour valider/comparer/confirmer/affiner les diagnostics biologiques des foyers de botulisme animal, et en particulier pour les bovins pour lesquels la confirmation biologique du diagnostic est très souvent problématique.
- 2) Les données épidémiologiques du botulisme animal en France à partir des résultats d'analyses des 6 dernières années du LNR, de l'ONCFS, du GDS, de l'ANSES et du CNR ont été échangées et on fait l'objet de plusieurs communications. Cette mise en commun des données de surveillance des différents acteurs a été reprise et élargie dans le cadre d'une demande de la DGAL d'actualisation des connaissances du botulisme animal et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.
- 3) Le CNR et le LNR coopèrent à l'investigation des foyers de botulisme bovin et aviaire, notamment des oiseaux sauvages en collaboration étroite avec l'ONCFS et le réseau SAGIR.

Dans le cadre de l'ANR **ClostAbat** : « Characterization of the *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses » (2022-2025) soumise par Dr. O. FIRMESSE; **projet collaboratif impliquant le CNR et son laboratoire associé**. Ce projet de recherche vise à évaluer la contamination des élevages de bovins, volailles et porcin au moment de l'équarrissage et à comparer les souches d'origine animale aux souches isolées d'infections humaines. Le laboratoire *C. difficile* associé au CNR est responsable du WP4 relatif à la caractérisation génomique des souches de *C. difficile* et *C. perfringens*. Cette ANR fait suite au projet DIFALIBO qui a évalué la prévalence de *C. difficile* dans les aliments impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et dans différents élevages animaux. Ce projet a donné lieu à plusieurs communications.

Autres programmes de collaboration :

CNR Bactéries anaérobies et Botulisme :

Programme NRBC-E « Projet H2O »

Dans le cadre de ce projet interministériel de défense NRBC-E, le CEA a développé puis fait faire produire des prototypes industriels de tests de diagnostic rapide (tests bandelettes) pour la détection de la toxine CPE (Entérotoxine de *Clostridium perfringens*) dans les diarrhées de patients. Les prototypes de bandelettes ont été produits en décembre 2024, ont une péremption de 2 ans (Nov 2026). LE CNR prévoit de tester ces prototypes au fil de l'eau sur de vrais échantillons de selles.

Génomique des populations et résistance aux antibiotiques du groupe *Bacteroides fragilis*

Le travail de thèse de Gauthier Delvallez se poursuit, malgré son départ du CNR. L'optimisation des outils de détection des résistances pour améliorer la surveillance par l'implémentation d'une base de données partagée (BIGSDB) est en cours de finalisation.

Laboratoire associé « *Clostridioides difficile* » :

Co direction de thèse de sciences (Anaïs Lemaire) avec le Dr Poquet Isabelle (Institut Micalis, INRAE, Domaine de Vilvert, Bât 442, 78352 Jouy-en-Josas Cedex) sur : "*Clostridioides difficile* chez les Equidés : rôle des biofilms dans la colonisation, le portage asymptomatique ou la virulence, et la persistance des infections" (CLODIFFEQUI 2.0).

Clostridium difficile est un entéro-pathogène anaérobie strict et sporulant de l'homme et des animaux qui émerge après un traitement antibiotique et cause des diarrhées et colites via ses toxines. La capacité des souches toxigènes à coloniser et à persister sans symptôme, qui pourrait impliquer des biofilms, pose des problèmes de rechutes et de dissémination. Dans un projet en cours avec l'Anses, des souches sont isolées des contenus intestinaux de #150 équidés autopsiés, leur profil toxigène ou non déterminé. Un diagnostic d'infection permet d'établir leur virulence in vivo, et de les classer en trois groupes ('non toxigènes', 'toxigènes portées' ou 'toxigènes causes d'infection'). La thèse débutera par le séquençage des génomes des souches, l'analyse des gènes de résistance aux antibiotiques et de formation de biofilms, et l'évaluation, par comparaison aux souches d'origine humaine, de leur potentiel de transmission zoonotique. Les souches seront ensuite étudiées i) pour leur capacité à former de biofilms in vitro, ainsi que ii) pour leur mode de colonisation in vivo observé in situ, dans l'intestin de leur hôte équidé, mais aussi iii) du modèle souris mono-associées à trois souches, représentatives des groupes. Le projet permettra d'évaluer le rôle des biofilms dans le cycle de *C. difficile*, la colonisation, le portage et la persistance des infections.

PETRY S., TAPPREST J., MAILLARD K., BARBUT F., FABIEN DUQUESNE F., KOZAK S., FOUCHER N. BERNEZ-ROMAND M., BRIDOUX L., POQUET I. *Clostridioides difficile* in Equidae necropsied in Normandie, 1 France, in 2019-2021: common carriage of toxigenic strains and virulence of emerging ribotype 017 Microbiol. Spectrum 2026, Dec 30:e0216525

LEMAIRE A., BRIDOUX L., COSTACHE V., DUPUY B, BARBUT F., PETRY S., POQUET S. In vitro biofilms of *Clostridioides difficile* undomesticated strains: morphology and properties according to strain diversity. NPJ Biofilm Microbiome 2026, soumis

Projet ClostENVIR (« Collecte et séquençage de souches de *Clostridioides difficile* de réservoirs environnementaux pour alimenter des modèles d'attribution de sources ») (Unité HQPAP, C. Le Marechal, Anses Ploufragan et Unité SBCL, Anses O. Firmesse et plateforme EURALIM, L. Guiller).

L'objectif du projet vise à répondre à explorer le concept du Onehealth au travers de l'étude des souches de *C. difficile* isolées de réservoirs environnementaux diverses (eaux, aliments, sols, animaux, humains) pour comparer la diversité génomique, les caractéristiques des souches en termes de gènes de résistance, facteurs de virulence, prophages, séquences d'insertions, etc... Cette collection de souches permettra de renforcer les modèles d'attribution de sources qui seront appliquées par L. Guiller.

Projet Clost Re-USE (« Réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation des cultures : devenir de *Clostridioides difficile* et *Clostridium perfringens* et de leurs gènes de résistance de la station au consommateur ») (C. Le Marechal Anses- Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort Unité HQPAP (coordinateur), INRAE, UMR 1347 Agroecology, Dijon, CNR anaerobies, Paris. **Projet collaboratif impliquant le CNR et son laboratoire associé.**

Pour faire face au changement climatique et aux enjeux autour de la ressource en eau dans le contexte actuel de multiplication des épisodes de sécheresse, il est impératif d'envisager de nouvelles pratiques, parmi lesquelles figure la réutilisation des eaux usées (Reuse) en provenance de stations d'épuration pour l'irrigation des cultures. La réglementation a évolué en 2023 pour encadrer la Reuse. Bien que très vertueuse d'un point de vue durabilité, cette pratique, nouvelle en Europe pourrait contribuer à disséminer dans les sols certaines bactéries pathogènes et ainsi constituer un nouveau risque de contamination des productions agricoles. Cette question se pose en particulier pour les espèces bactériennes capables de former des spores, forme de résistance permettant à la bactérie de persister dans l'environnement pendant de longues périodes, à l'image des clostridies pathogènes pour l'Homme et les animaux telles que *Clostridioides difficile* (CD) et *Clostridium perfringens* (CP). Le devenir des clostridies au cours du traitement des eaux usées, lors de leur retour au sol ou de leur utilisation pour l'irrigation des cultures a été peu étudié jusqu'à présent, notamment en France. Ces éléments sont pourtant indispensables pour permettre l'évaluation des risques associés à cette nouvelle pratique que ce soit pour la santé humaine, animale ou la contamination environnementale.

Dans ce contexte, les objectifs sont de déterminer :

- La distribution et le comportement des clostridies pathogènes dans les eaux de stations d'épuration, les sols recevant ces eaux et les végétaux irrigués, à l'échelle du terrain et en conditions expérimentales
- La caractérisation et diversité des souches de CD et CP isolées de ces matrices avec un focus sur les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques
- L'évaluation de la capacité des clostridies à transférer des gènes de résistance aux antibiotiques lors de la consommation des produits ayant été irrigués de cette façon

MROZINSKI A, MARTAK D, LORIA PM, POEZEVARA T, ROUXEL S, DUCRET L, EHMIG M, BARBIER E, DEPRET G, DIANCOURT L, THIOUR-MAUPRIVEZ C, MARTIN-LAURENT F, BARBUT F, LE MARECHAL C, TOPP E Treated wastewater irrigation and pathogen dissemination across the food chain and environment: A One Health study of *Clostridioides difficile*. One health summit 2026, accepté.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

CNR laboratoire coordonnateur :

Méthode Endopep SIA pour la recherche de toxines botuliques

Le CNR a été contacté par l'Institut Robert Koch (RKI) en Allemagne, qui propose une évaluation internationale de la méthode Endopep-SIA développée au RKI pour la recherche de toxines botuliques.

La méthode est un test immunologique basé sur la technologie Luminex : les toxines sont extraites via des anticorps monoclonaux spécifiques de la toxine ou des récepteurs fonctionnalisés. Après extraction, l'activité catalytique des toxines botuliques est détectée via des anticorps monoclonaux spécifiques du néoépitope. Cette approche appelée Endopeptidase suspension immunoassay (Endopep-SIA) constitue une nouvelle procédure, qui pourrait être utilisée dans les laboratoires de diagnostic et contribuerait à réduire les tests sur les animaux dans le futur.

Laure Diancourt s'est rendu à Berlin en juin 2024 à l'Institut Robert Koch pour se former sur la technique et des essais inter-laboratoires ont été réalisés en collaboration avec la DGA/MNRBC dans leurs laboratoires équipés et autorisés pour ce type de projet en novembre 2024 puis en février 2026. Le CNR a par ailleurs acquis le matériel nécessaire pour le développement de cette technique dans ses locaux.

CHABOTE : Conditions Hydro-écologiques d'Apparition du Botulisme et Occurrence de Toxines en Etangs (OFFICE FRANÇAIS DE LA BIODIVERSITÉ / ANSES - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort / ANSES - Laboratoire de la rage et de la faune sauvage/ CNR Bactéries anaérobies et Botulisme)

Au niveau mondial, le botulisme aviaire représente la maladie la plus importante en termes de mortalité chez les oiseaux migrateurs. Agent pathogène pouvant être zoonotique, ubiquiste dans l'environnement naturel et dont le cycle biologique (passage par des formes sporulées, végétatives et toxinogénèse) est dépendant de facteurs environnementaux, l'étude de *C. botulinum* s'inscrit dans une approche intégrée relevant de la santé de l'écosystème. L'objectif du projet Chaboté est de déterminer dans quelles conditions limnologiques et ornithologiques un épisode de botulisme aviaire, est susceptible de survenir. Pour répondre à cet objectif, plusieurs sous-objectifs sont prévus : 1) déterminer les conditions et processus écologiques à l'oeuvre dans les écosystèmes lenticques favorisant la croissance de la bactérie et la production de toxines par *C. botulinum* de type C/D et E, bactéries responsables du botulisme aviaire en France ; 2) identifier les matrices environnementales hébergeant *C. botulinum*, permettant son transfert depuis les sédiments jusqu'au compartiment cible représenté par les oiseaux. 3) identifier les facteurs de risque d'exposition des oiseaux d'eau à *C. botulinum* et à la toxine, liés à leur biologie et écologie.

RESILIENCE (CEA)

En réponse à l'appel à projets lancé par le Fonds européen de défense, le partenariat-cadre RESILIENCE a été mis en place dans le but de créer un écosystème européen de collaboration contre les menaces NRBC actuelles ou futures (Nucléaire, Radiologique, Biologique et Chimique). RESILIENCE est coordonné par le CEA et rassemble des instituts médicaux militaires, des instituts et organismes de recherche, des universités, des hôpitaux, des industries, des entreprises de taille intermédiaire et des PME. L'Institut Pasteur est honoré d'être sélectionné parmi ces 100 partenaires européens, le CNR bactéries anaérobies et botulisme participera à la partie traitement des maladies liées à l'exposition aux menaces NRBC (début prévu en 2027). Les informations plus spécifiques à ce projet sont confidentielles.

Etude de *C. botulinum* du groupe III (Consortium européen : ANSES / CNR botulisme Italie / CNR botulisme Belgique / CNR Botulisme animal Pays-Bas / CNR Botulisme Danemark/ CNR Bactéries anaérobies et Botulisme)

Actuellement, peu de souches de *C. botulinum* du groupe III ont été isolées et publiées, il y a donc peu de données sur la diversité génétique de ce groupe et sur ces particularités. Ce consortium a pour but de réaliser un inventaire des souches disponibles dans les laboratoires partenaires afin de réaliser une analyse phylogénétique globale et ainsi mieux comprendre l'origine de ces zoonoses et les prévenir.

Actualisation des recommandations de l'antibiogramme des bactéries anaérobies.

À partir de 2026, le CNR prévoit de conduire un travail d'actualisation et d'évolution des recommandations relatives à l'antibiogramme des bactéries anaérobies.

Ce projet aura pour objectifs :

- d'améliorer la qualité et la cohérence des données de contrôle interne de qualité (CIQ),
- de clarifier les zones d'incertitude technique,
- de favoriser une harmonisation avec les recommandations européennes.

Cette démarche bénéficiera de l'expertise du Dr Marlène Amara, nouvelle responsable du CNR, membre du CA-SFM et de l'EUCAST, qui contribuera au lien entre les pratiques nationales et les orientations européennes.

Laboratoire associé « *Clostridioides difficile* » :

Mise au point et apport du typage CRISPR à l'étude épidémiologique de *C. difficile* (collaboration avec O. SOUTOURINA, I2BC UMR 9198, Université Paris -Saclay)

Le polymorphisme du système CRISPR-Cas a été utilisé comme méthode de typage (appelée «spoligotypage») pour les principaux agents pathogènes (par exemple *Mycobacterium*, *Salmonella*) mais jamais pour *C. difficile*.

L'objectif principal de ce projet est de développer un nouvel outil de typage pour 1) l'analyse de la diversité des « spacers » CRISPR de *C. difficile* à partir d'isolats cliniques et de selles de patients à des fins épidémiologiques et 2) une évaluation rapide de la sensibilité aux phages des souches de *C. difficile*.

Une étude pilote ciblée sur l'amplification répétée des « spacers » de *C. difficile* a démontré la grande efficacité (> 85%) pour l'évaluation du répertoire des « spacers » CRISPR dans les isolats cliniques et les échantillons de selles des patients. Nos objectifs sont i) d'optimiser les pipelines d'amplification et d'analyse bioinformatique pour obtenir une récupération complète des « spacers » à partir d'échantillons de selles et d'isolats cliniques ii) d'appliquer la méthode à une plus grande collection de souches d'origines différentes afin d'estimer son pouvoir discriminant par rapport à d'autres méthodes de typage tels que cgMLST, wgMLST ou MLVA iii) analyser les souches responsables de récurrences afin d'étudier la microévolution de la souche de *C. difficile* par l'adaptation à son environnement riche en phages. Les résultats escomptés pourraient être utiles pour le développement de futures applications cliniques, et des approches thérapeutiques personnalisées basées sur les phages.

ANR Cdiffense RNA ("Roles and interplay between RNA-based defense systems in the interactions of *Clostridioides difficile* with phages") (coordonnée par O. Soutourina, I2BC, Paris Saclay) (2024-2029)

L'objectif général du projet CDefenseRNA est de déchiffrer l'interaction originale entre les systèmes de défense à base d'ARN CRISPR-Cas, TA et Abi et leur contribution à l'adaptation CD et aux interactions avec les phages. Nos objectifs spécifiques sont de déterminer 1) les rôles et l'interaction des systèmes de défense à base d'ARN dans la défense contre les phages, les processus de régulation, la réponse au stress et l'adaptation pendant l'infection ;2) leurs mécanismes d'action et les déterminants moléculaires de l'interaction de l'ARN avec les machineries protéiques en tant que cibles pour de futures stratégies inhibitrices ; 3) l'histoire évolutive, la distribution, l'association avec les MGE et le transfert par les phages des systèmes de défense à base d'ARN chez les bactéries.

Notre hypothèse est que les systèmes de défense à base d'ARN sont fonctionnellement liés dans le CD, contribuant à l'évolution génomique et à l'adaptation au sein de l'hôte. Les systèmes de défense codés dans les prophages devraient contribuer à leur propagation au sein de la population bactérienne.

Etude sur la fréquence de transmission intrahospitalière de *C. difficile* (Hôpital Saint-Antoine, AP-HP ; et Institut Pasteur, Laure Diancourt) **projet collaboratif impliquant le CNR et son laboratoire associé.**

Clostridioides difficile est la première cause de diarrhées associées aux soins chez l'adulte. La transmission se fait par voie orale via les spores capables de résister dans l'environnement. La PCR-ribotypage, technique utilisée en routine pour caractériser les souches de *C. difficile*, n'a pas un pouvoir discriminant suffisant pour étudier les événements de transmission. L'objectif de ce travail était de déterminer la fréquence de transmission des souches de *C. difficile* hors

contexte épidémique par cgMLST (core-genome Multi-Locus Sequence Typing), une méthode de typage très discriminante basée sur la comparaison des variations alléliques des souches.

Toutes les souches de *C. difficile* isolées entre le 01/01/2024 et le 10/10/2024 dans notre hôpital ont été incluses. Ces souches ont été caractérisées par PCR ribotypage et par cgMLST. L'analyse par cgMLST a été réalisée sous Unix sur le cluster de l'Institut Français de Bioinformatique. Les séquences ont été nettoyées avec fastp v0.12.1 puis assemblées avec shovill v1.0.9. Le cgMLST a été effectué grâce à l'outil ChewBBACA v3.3.4 et les résultats ont été visualisés sous forme de minimum spanning tree dans le logiciel GrapeTree. Deux souches étaient considérées comme clonales lorsqu'elles présentaient au maximum 3 allèles de différence. Les différents types de transmissions étaient les suivants : patient à patient (hospitalisation en même temps dans le même service), via l'environnement (même service à des temps différents), intra-hospitalière (hospitalisation simultanée dans des services différents) ou cryptique (pas de lien épidémiologique mais souches identiques).

Au total 181 souches isolées chez 125 patients ont été analysées. Trois souches ont été exclues de l'analyse en raison d'une mauvaise qualité de séquençage. Les souches appartenaient principalement aux PCR ribotypes 106 (n=14), 020 (n=13) et 002 (n=13). L'analyse cgMLST de 178 souches a montré que 25 paires de souches étaient clonales, dont 22 paires de souches de même PCR-ribotype. Douze paires de souches avaient été isolées chez un même patient et correspondaient donc à des récives. Sur les 13 événements de transmission potentielle (10,4 %) entre 2 patients, 4 transmissions patient à patient, 1 via l'environnement, 3 intra-hospitalières et 5 cryptiques ont été identifiées.

L'analyse par cgMLST a permis de déterminer les proportions des différents types de transmission intra-hospitalière d'infections à *C. difficile*. La majorité des transmissions est cryptique, sans lien épidémiologique identifié entre les patients.

J COUTURIER, M. EHMIG, Y. ROUKOZ-DIAB, I. MOSTAGHAT, S. LUCE, V. MESA, F. BARBUT. Etude de la transmission intra-hospitalière de *Clostridioides difficile* par analyse du génome entier. Congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière, 3-5 juin 2026, Lille

Evaluation du Vivalytic simplex *C. difficile* et du Vivalytic triplex (*C. difficile*, Norovirus, Rotavirus) pour le dépistage des souches toxigènes de *C. difficile* dans les selles.

L'objectif principal de cette étude est de comparer les performances (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives, exprimées avec leurs intervalles de confiance à 95 %) des tests Vivalytic pour la détection de *Clostridioides difficile* et de comparer les résultats obtenus avec ceux du test Xpert pour la détection de *C. difficile* toxigène dans les selles. L'objectif secondaire est de comparer le test Vivalytic pour la détection de *C. difficile* sur des selles brutes avec le même test réalisé sur des selles prélevées par écouvillonnage (Copan).

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Le laboratoire des Anaérobies de l'Institut Pasteur a été reconnu comme Centre National de Référence des anaérobies en 1972, et il a été reconduit comme Centre National de Référence des Bactéries anaérobies et du botulisme en 2005, 2011, 2017 et 2023.

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme (CNRBAB) a pour mission, selon le cahier des charges défini par Santé publique France (SpF), d'une part, la surveillance des infections à bactéries anaérobies (identification des souches transmises par les laboratoires hospitaliers et les laboratoires d'analyses médicales, détermination de la sensibilité aux antibiotiques, investigation et alerte à SpF des affections graves à anaérobies notamment à *Clostridioides difficile*), et d'autre part le diagnostic et la surveillance du botulisme en relation avec SpF. Depuis avril 2007, le laboratoire d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Hôpital St Antoine (responsable, F. Barbut) a été nommé par SpF comme laboratoire associé du CNR des Bactéries anaérobies et Botulisme pour les expertises sur *Clostridioides difficile*. Il a été reconduit dans ses fonctions en 2011, 2017 et 2023. Le CNRBAB tente de maintenir quelques activités de recherche et développement en relation avec ses activités d'expertise et essentiellement en collaboration, notamment en taxonomie, identification des bactéries anaérobies, caractérisation des souches de *Clostridium botulinum*, techniques alternatives au test biologique sur souris pour la détection, l'identification et la quantification des toxines botuliques. Ces activités sont limitées par le manque de personnels, locaux et équipements dédiés.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

CNR Bactéries anaérobies et Botulisme:

Nom	Fonction	ETP	Financement
M. Amara (Recrutement juin 2025 – prise de fonction janvier 2026)	Pharmacien biologiste	1	IP - SpF
C. Rouard / A-S. Le Guern / F-X. Weill (depuis 2025)	Pharmacien/Médecin Biologiste (signature et prestation de conseil)	0,10	IP - SpF
Laure Diancourt	Ingénieure	0,9	IP - SpF
Julie Germond	Technicienne supérieure	1	IP - SpF
Jean Sautereau	Technicien supérieur	1	IP - SpF
Rahil Chougui	Assistante administrative	0,5	IP - SpF

Laboratoire associé *Clostridioides difficile*:

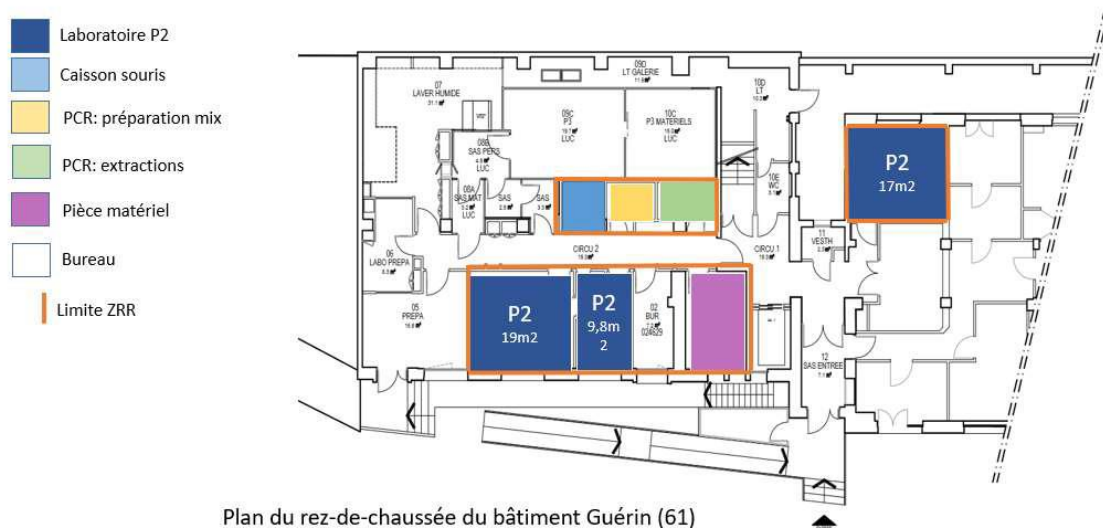
Nom	Fonction	ETP	Financement
F. Barbut	PU-PH	0,3	AP-HP
J. Couturier	MCU-PH	0,15	AP-HP
I. Mostaghat	AHU	0,15	AP-HP
C. Eckert	MCU-PH	0,25	AP-HP
Muriel Ehmig	Ingénieure hospitalier	1	SPF
Yasmine Roukoz Diab	Ingénieure hospitalier	1	SPF
Solweig Luce	Technicienne	1	SPF
Réception/secrétariat/gestion		0,27	AP-HP

1.3 Locaux et équipements

► Locaux :

Les locaux du CNR sont situés au 25 rue du Dr Roux à l'Institut Pasteur et comprennent :

- 2 espaces bureaux : 1 espace de 7,5 m² au rez-de-chaussée (en blanc sur le plan ci-dessous), et un deuxième espace de 18,5 m² au 1er étage.
- des pièces techniques (plan disponible ci-dessous) :



Architectural floor plan of the future microbiology laboratory at Hôpital Universitaire Est Parisien, Saint Antoine. The plan shows various rooms including Bactériologie, Parasitologie, Tertiaire, Microbio, and Diag Rapide. A legend on the right identifies the color-coded areas: Bactériologie (blue), Parasitologie (pink), Tertiaire (orange), Microbio (purple), and Diag Rapide (yellow). The plan also includes a scale bar, a north arrow, and a list of rooms with their respective areas. A text box on the right lists the four modules: Module 1: Préparation des mix de PCR, Module 2: Extraction d'ADN, Module 3: Thermocycleurs, and Module 4: Dilution de PCR - Electrophorèse. The plan is dated 2014 and includes a signature of the architect.

Équipements de base pour la bactériologie anaérobie :

- Des jarres anaérobies avec système automatique de remplissage de gaz (type Anoxomat ou équivalent) ainsi qu'une enceinte anaérobie dédiée
- Des étuves à 35°C +/- 2°C
- Des postes de sécurité microbiologique (PSM) de type II
- Des centrifugeuses réfrigérées et de paillasse
- Des systèmes de chauffage : bains-marie, blocs chauffants, becs chauffants et agitateurs magnétiques chauffants
- Des microscopes
- Des enceintes réfrigérées pour le stockage des réactifs et des échantillons : réfrigérateurs, congélateurs – 20 °C et –80 °C
- Un container d'azote liquide pour la conservation des souches de référence et des isolats (laboratoire coordonnateur)
- Un spectrophotomètre pour la mesure de la densité optique (600 nm) (Laboratoire associé)
- 1 lecteur de plaque d'antibiogrammes en microdilution

Équipements de biologie moléculaire :

- Des hottes PCR à flux unidirectionnel assurant la sécurité et la stérilité des manipulations
- Des pipettes multicanaux, multipettes électroniques et autres systèmes de distribution de précision
- Des appareils d'amplification génique (PCR standard et PCR en temps réel)
- Des cuves et générateurs d'électrophorèse
- Un lecteur et analyseur d'images de gels
- Un séquenceur d'ADN (Laboratoire associé)
- Des spectrophotomètres pour la quantification des acides nucléiques (type Nanodrop)
- Des logiciels dédiés à l'analyse des séquences et des profils génétiques
- Un système d'électrophorèse en champ pulsé pour le typage des souches (Laboratoire associé)
- Des logiciels d'analyse dédiés au traitement et à la comparaison des profils moléculaires

Équipements de biochimie :

- Des équipements d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), dispositifs de transfert sur membrane et de détection immunologique (laboratoire coordinateur).

Animalerie :

- Animalerie souris pour les tests de toxicité, notamment détection et identification des toxines botuliques

1.4 Collections de matériel biologique

Le CNR conserve toutes les souches de bactéries anaérobies non-MOT reçues en container à azote liquide, les plus anciennes souches sont conservées lyophilisées. La collection du CNR début 2023 s'élevait à 3530 souches de bactéries anaérobies (hors MOT).

Pour le botulisme et *C. difficile*, se référer à l'annexe 4.

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise en matière de bactériologie anaérobie en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues (à noter que la collection CNR est donc préservée).

L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNR est conditionné :

- à ce que l'utilisation envisagée du matériel biologique réponde à un objectif de santé publique
- à la mise en place de documents contractuels spécifiques.

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords

ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial. En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également théoriquement dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique. A tout le moins, les résultats du projet sont théoriquement systématiquement communiqués au CNR.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNR Bactéries anaérobies et botulisme 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 apportent ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction Médicale ;
- 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 2022 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.

Le laboratoire associé *C. difficile* est intégré au DMU BioGemH (AP-HP Sorbonne Université) qui est accrédité sur le management de la qualité selon la norme 15189 v2022 (site COFRAC, N° accréditation 8-2542).

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles qualité externes (CQE). Pour les analyses de référence et d'expertises pour lesquelles il n'y a pas de programme commercial, les CNR organisent des essais inter-laboratoires (EIL) avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

Ainsi, pour le botulisme, le CNR participe chaque année et pour la 10ème année consécutive à un EIL avec l'Institut de recherche biovétérinaire de Wageningen (WBVR, The Netherlands), le Laboratoire National du Botulisme et autres Clostridies zoonotiques belge (Institut de Santé, Sciensano) et plus récemment l'ANSES (LNR Avian Botulism, France) afin d'évaluer, de comparer et d'échanger sur la capacité et la méthodologie de ces différents laboratoires pour le diagnostic du botulisme humain et animal. Il est important de préciser qu'au regard des contraintes de

réglementation ANSM liées à la cession, importation, exportation et transport des Microorganismes et Toxines (MOT), ces essais sont lourds et très onéreux à organiser et réaliser. En 2025, l'EIL a été organisé par Sciensano. Les résultats obtenus par le CNR pour les 5 échantillons artificiellement contaminés par de la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* étaient tous conformes.

Pour la partie *C. difficile*, le laboratoire associé participe chaque année et pour la 11ème année consécutive en 2025, à un EIL en collaboration avec le Centre National de Référence pour *Clostridioides difficile* en Belgique (Sciensano, Pr Ahalieyah Anantharajah). Le panel était constitué de 3 souches A, B et C choisies parmi les 23 souches de référence de *Clostridioides difficile* provenant de la collection européenne établie par J. Brazier-E. Kuijper. La recherche des facteurs de virulence (délétion dans le gène *tcdC*, gènes codant la toxine binaire) a également été incluse dans le contrôle de qualité. Ce contrôle de qualité a permis de mettre en évidence une excellente concordance entre les méthodes de typage et de détection des facteurs de virulence utilisées en Belgique et les méthodes utilisées en France.

Pour la partie souches anaérobies, le CNR participe aux CQE commerciaux ProBioQual. En 2025, tous les résultats étaient également conformes.

L'année qualité 2025 du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Revue qualité	04 avril 2025
Revue de direction LREMS	24 juin 2025
Audits internes qualité et technique	24 novembre 2025
Audit de surveillance COFRAC	14-18 Avril 2025
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	06 janvier 2026

Lors de l'évaluation de renouvellement COFRAC d'avril 2025, les évaluateurs ont accordé leur confiance au LREMS qui a démontré lors de son évaluation une réponse aux exigences qualité et techniques de la version 2022 de la norme ISO 15189.

Perspectives 2026 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	Janvier-avril 2026
Audits internes qualité et technique	Janvier - décembre 2026
Revue de direction LRE-MS	à planifier
Audit de surveillance	Mars 2027

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

	Laboratoire coordonnateur	Laboratoire associé	Accrédité
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	Diffusion en milieu gélosé (disques et bandelettes), Microdilution en milieu liquide, interprétation selon CASFM/EUCAST en vigueur		Non
Détection de gènes par PCR	Temps réel : <u>Gènes de neurotoxines botuliques A, B, E, F, C, C/D, D et D/C</u> Gènes de toxines alpha et CPE de Clostridium perfringens Gènes de toxines Hbl, Nhe, Ces et CytK1 de Bacillus cereus	Point final + électrophorèse capillaire Gènes cdtA et cdtB codant la toxine binaire (détection de la forme complète et de la forme tronquée) Fragments A3 du gène tcdA et B1 du gène tcdB, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B Séquence de 115 pb qui remplace le PaLoc chez les souches non toxigènes, permettant de confirmer l'absence des gènes tcdA et tcdB (PCR lok1-lok3) Mise en évidence d'une délétion dans le gène tcdC : les différents types de délétion du gène tcdC existants (18 pb, 39 ou 36 pb et 54 pb)	<u>PCR Gènes de neurotoxines botuliques A, B, E, F, C, C/D, D et D/C : Oui</u> Demande d'extension d'accréditation faite en 2026 pour l'identification des facteurs de virulence de C. difficile par PCR
Détermination du toxinotype	Point final : Gènes des neurotoxines botuliques (A à G) et des protéines associées aux complexes botuliques Gènes des toxines de C. perfringens : alpha, bêta1, bêta2, iota, entérotoxine, delta, epsilon, théta, cytotoxine TpeL, netB. Confirmation de la délétion du gène de la toxine théta. Détermination du support (chromosomique ou plasmidique) du gène de l'entérotoxine Gènes des toxines de C. sordellii (LT, HT), neuraminidase, lécithinase Gènes des toxines alpha de C. septicum, C. oedematiens - Gènes des flagellines de C. oedematiens, C. chauvoei - Gène de l'entérotoxine de Bacteroides fragilis Gènes de sporulation Gènes de résistance aux antibiotiques [métronidazole ; β-lactamines (gènes cepA, cfxA et cfiA, séquences d'insertion IS 942, IS1186, ISBF417) Bacteroides gpe fragilis.	Point final + restriction Détermination du toxinotype après restriction des fragments A3 et B1 par différentes enzymes de restriction	Les autres PCR ne sont pas accréditées

PCR- ribotypage		Typage et comparaison de souches (investigation des cas groupés)	Non
Diagnostic		Détection à partir des selles de la GDH et des toxines libres A et B par test immunochromatographique Détection des gènes de la toxine B directement à partir des selles.	
Identification bactérienne	Amplification de l'ARN 16S NGS (ANI)	Amplification de l'ARN 16S <u>Spectrométrie de masse MALDI-TOF</u>	<u>Oui</u> (identification par spectrométrie de masse)
Typage		MLVA (Multilocus Variable-number tandem repeat Analysis) MLST (MultiLocus Sequence Typing)	Non
NGS	Séquençage NGS recherche de facteurs de virulence et gènes de résistance, comparaison de souches	cg MLST wgMLST cgSNP	Non
Recherche de toxines	<u>Détection, identification et typage des neurotoxines botuliques par test de létalité sur souris</u>		<u>Oui</u>

NB : Les PCR-ribotypes et les facteurs de virulence de *C.difficile* sont identifiés par PCR et méthode d'électrophorèse capillaire selon les recommandations européennes de l'ECDC (Laboratory procedures for diagnosis and typing of human *Clostridium difficile* infection (europa.eu)). Les profils de PCR ribotypage sont identifiés à l'aide du site Web-Ribo (<https://webribo.ages.at/>).

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Sans objet

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

Cf Annexe 3

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

Cf Annexe 4