

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2024

CNR Bactéries anaérobies et botulisme

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	Institut Pasteur	Dr Christelle Mazuet
Laboratoire Associé	Saint-Antoine, APHP	Pr Frédéric BARBUT

LIVRET 1 :

**CNR coordinateur
Bactéries anaérobies et botulisme**

**Dr Christelle MAZUET
Institut Pasteur**

Résumé analytique.....	5
Faits marquants.....	5
Executive summary	6
Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Organigramme	7
Mission et Organisation	7
Démarche Qualité	7
2. Activités d'expertise	10
2.1 Evolution des techniques	10
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	12
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	14
3. Activités de surveillance.....	15
3.1 Description du réseau de partenaires	15
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	15
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	20
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	22
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	22
4. Alertes	22
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	23
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	23
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	23
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...).....	23
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	24
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	24
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	26
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	28
8. Programme d'activité pour les années suivantes	29
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	30
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	30

1.2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	30
1.3	Locaux et équipements	30
1.4	Collections de matériel biologique.....	32
1.5	Démarche qualité du laboratoire	33
2.	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	33
2.1	Liste des techniques de référence	33
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	34
3.	Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	35
4.	Annexe 4 : Recensement des collections de matériels biologiques (non destinées à être rendues publiques)	35

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

Le CNR bactéries anaérobies et botulisme et le laboratoire associé *Clostridioides difficile* assurent la surveillance du botulisme, des infections à *Clostridioides difficile*, ainsi que l'identification et la caractérisation de souches de bactéries anaérobies.

Cette année 2024 a été marquée au niveau organisationnel par l'absence prolongée de Christelle MAZUET et le départ de Gauthier Delvallez en octobre.

Concernant nos activités d'expertise sur le botulisme :

- La prise en charge de 661 prélèvements à visée diagnostique (385 prélèvements humains, 276 prélèvements alimentaires, 4 prélèvements environnementaux, et 47 prélèvements vétérinaires).
- La détection de 8 foyers de botulisme alimentaire (dont la crise sanitaire de Tours en septembre), 6 foyers de botulisme animal, 5 suspicions de botulisme iatrogène (dont alerte internationale ECDC) et un cas de botulisme infantile.
- Le renouvellement d'une première partie de nos stocks de sérums neutralisants.

Concernant nos activités d'expertises sur les bactéries anaérobies :

- La prise en charge de 218 souches anaérobies (168 souches isolées, 23 prélèvements pour recherche de pathogènes spécifiques et 27 souches réisolées de prélèvements reçus au CNR à des fins de diagnostic.
- La détection pour la première fois en France, d'une souche de *Clostridium perfringens* porteuse des gènes codant pour l'entérotoxine binaire BEC.
- La détection d'une souche de *Bacteroides fragilis* porteuse du gène *cfiA*.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

The National Reference Center (NRC) for Anaerobic Bacteria and Botulism and the associated *Clostridioides difficile* laboratory are responsible for the surveillance of botulism, infections caused by *Clostridioides difficile*, as well as the identification and characterization of anaerobic bacterial strains.

In 2024, there were some organizational changes marked by the prolonged absence of Christelle MAZUET and the departure of Gauthier Delvallez in October.

Regarding our botulism expertise activities:

- Handling of 661 diagnostic samples (385 human samples, 276 food samples, 4 environmental samples, and 47 veterinary samples).
- Detection of 8 outbreaks of foodborne botulism (including the health crisis in Tours in September), 6 animal botulism outbreaks, 5 suspected cases of iatrogenic botulism (including an international ECDC alert), and one case of infant botulism.
- Renewal of the first part of our stock of neutralizing sera.

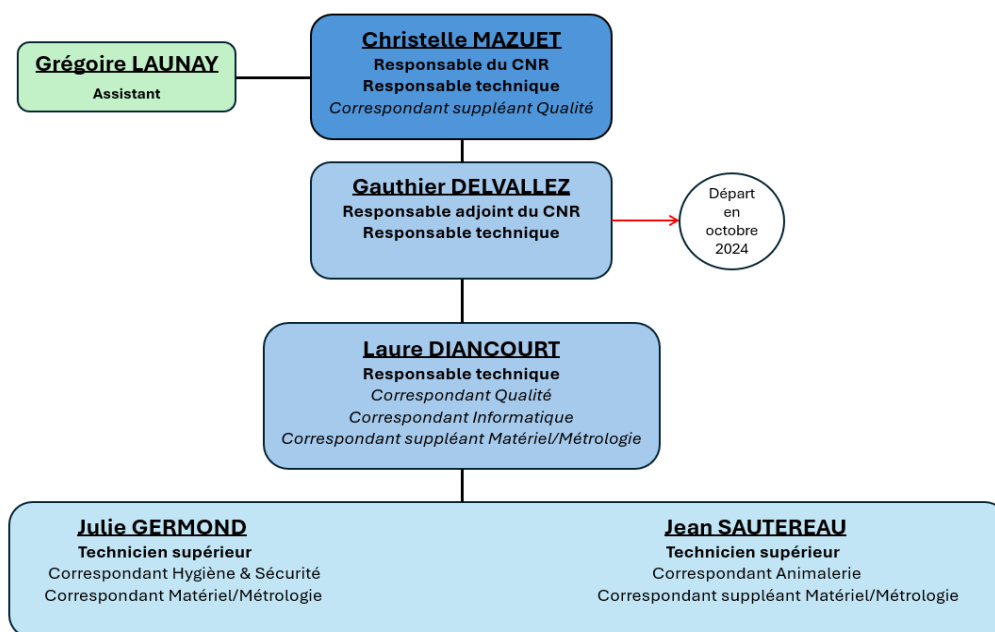
Regarding our expertise activities on anaerobic bacteria:

- Handling of 218 anaerobic strains (168 isolated strains, 23 samples for the search of specific pathogens, and 27 strains re-isolated from samples received at the NRC for diagnostic purposes).
- First detection in France of a *Clostridium perfringens* strain carrying the genes encoding the binary enterotoxin BEC.
- Detection of a *Bacteroides fragilis* strain carrying the *cfiA* gene.

1. Missions et organisation du CNR

En l'absence d'éléments nouveaux : renvoyer à l'annexe 1.

Organigramme



L'année 2024 a été marquée par :

- L'absence prolongée de Christelle Mazuet, suivi d'un retour à temps partiel ;
- Le départ de Gauthier Delvallez en octobre 2024.

Mission et Organisation

Sans objet : pas de changement majeur

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 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

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

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

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

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

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles qualité externes.

Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, 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 à un EIL avec l'Institut de recherche biovétérinaire de Wageningen (WBVR, The Netherlands, Miriam Koene & Marc Engelsma) et le Laboratoire National du Botulisme et autres Clostridies zoonotiques belge (Institut de Santé, Sciensano, Bruxelles, Tom Van Nieuwenhuysen) afin d'évaluer, de comparer et d'échanger sur la capacité et la méthodologie de nos trois 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 très lourds et très onéreux à organiser et réaliser. En 2024, l'EIL a été organisé par le WBVR. 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 souches anaérobies, le CNR participe aux essais inter laboratoires organisé par ProBioQual. En 2024, tous nos résultats étaient également conformes.

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

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Revue qualité 2024	04 avril 2025
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	24 juin 2024
Audits internes qualité	17 décembre 2024
Audit interne technique	02 juillet 2024

Ci-dessous sont détaillées les perspectives 2025 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Audits internes qualité et technique	Juin - décembre 2025
Revue de direction LREMS	A planifier
Audit de surveillance COFRAC	14-17 avril 2025

En 2024, le LREMS effectue sa transition vers la version 2022 de la norme ISO 15189. Un plan de transition a été établi par le service Qualité et il a été déployé tout au long de l'année 2024 au sein des CNR.

2. Activités d'expertise

Eléments de l'année 2024 en termes de production d'expertise :

808 prélèvements reçus au total dans le cadre de notre expertise sur le diagnostic et la surveillance du botulisme (451 prélèvements humains, 291 prélèvements alimentaires, 53 prélèvements vétérinaires et 4 prélèvements environnementaux).

218 prélèvements ou souches traitées au total dans le cadre de notre expertise sur les bactéries anaérobies (168 souches bactériennes, 23 prélèvements pour recherche de pathogènes spécifiques, et 27 souches réisolées de prélèvements reçus au CNR à des fins diagnostiques).

Renouvellement d'une première partie des stocks de sérums neutralisants anti-toxines.

Les descriptions des techniques et marqueurs disponibles sont présentées en annexe 2.

2.1 Evolution des techniques

Pas de nouvelle technique mise au point sur l'année 2024.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

N.A

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

N.A

2.4 Collections de matériel biologique

=> Cf Annexe 4 pour 2024

2.5 Activités d'expertises

➤ Activités d'expertise en bactériologie anaérobie (hormis *Clostridioides difficile*)

L'origine et le nombre d'échantillons reçus et analysés durant l'année 2023 sont donnés dans le tableau suivant. Au total le CNR a enregistré 218 dossiers concernant son activité d'expertise sur les bactéries anaérobies, versus 274 en 2023.

Origine	Nombre de souches	Nombre de prélèvements	Total
Humaine	152	7	159
Vétérinaire	3	14	17
Alimentaire	7	1	8
Autres	3	0	3
Reprises	27		27
EEQ	4	0	4
TOTAL	195	23	218

Le CNR a reçu 152 souches bactériennes d'origine humaine, soit pour les identifier ou confirmer l'identification (échec identification par Maldi-TOF), pour réaliser un toxinotypage, pour confirmer la résistance aux antibiotiques et/ou rechercher les gènes de résistance. Le CNR a également reçu sept échantillons de selles dans le cadre de recherches de TIAC à *Clostridium perfringens* (six TIAC à *Clostridium perfringens* confirmées).

Trois souches d'origine vétérinaire pour confirmation d'identification et toxinotypage ont été reçues au CNR (1 souche de *Clostridium novyi*, 1 souche de *Clostridium perfringens*, 1 souche de *Bacteroides pyogenes*), 10 prélèvements de contenu intestinal ont été reçus dans le cadre du projet *Clostridium colinum*, deux morceaux de muscle de bovin (présence de *Clostridium haemolyticum/chauvoei*).

Un seul prélèvement alimentaire a été reçu pour l'investigation de TIAC à *Clostridium perfringens*. Nous avons également reçu deux souches isolées par l'ANSES à but de comparaison avec les souches humaines isolées par le CNR.

Quatre prélèvements « autres » envoyés par la société Probioqual, ont été analysées au CNR en tant que contrôle qualité.

Enfin, 27 souches ont pu être isolées par le CNR à partir de différents prélèvements reçus, 16 étant des souches de *Clostridium botulinum* isolées à partir de prélèvements humains, alimentaires ou vétérinaires, 6 souches de *Clostridium perfringens* isolées à partir de selles reçus pour les suspicions de TIAC, et 4 autres souches de *Clostridium* sp. isolées de divers prélèvements.

➤ Activités d'expertise pour le botulisme

L'origine et le nombre d'échantillons reçus et analysés durant l'année 2024 sont donnés dans le tableau suivant. Au total le CNR a enregistré 661 dossiers concernant son activité d'expertise sur le botulisme, versus 738 en 2023.

Botulisme humain	385
Sérum (recherche de toxine botulique)	217
Selles (recherche de toxine botulique et de <i>Clostridium botulinum</i>)	160
Sérum (recherche d'anticorps neutralisants les toxines botuliques)	8
Échantillons agro-alimentaires	226
En relation avec une suspicion de botulisme humain	21
Autre (Industriels)	205
Échantillons environnementaux	3
En relation avec une suspicion de botulisme humain	0
Autre	3
Botulisme animal	47
Foie	15
Contenu intestinal	13
Sérum	8
Autres (rate, lique gastrique,...)	11
TOTAL	661

217 prélèvements de sérum, 160 prélèvements de selles ont été analysés dans le cadre de suspicion de botulisme humain. 8 sérums ont été reçus pour la recherche d'anticorps anti-toxine botulique de type A1 chez des patients ne répondant plus à leur traitement. Cette dernière recherche ne fait plus parti des analyses réalisées au CNR, faute de fiabilité.

21 aliments au total ont été analysés pour enquête alimentaire suite de la confirmation de plusieurs cas de botulisme humain, et 205 pour des industriels souhaitant exportés leurs aliments à l'international (prestation de service).

Enfin, 47 échantillons ont été reçus dans le cadre du diagnostic de botulisme animal (prestation de service).

Le CNR 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 en temps réel (le plus souvent en moins de 24h) par Fax/Téléphone et/ou mail aux cliniciens : de façon systématique lorsque le diagnostic biologique de botulisme est confirmé ainsi que pour tous les patients hospitalisés en réanimation.

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.

Durant l'année 2024, le CNR a ainsi séquencé le génome complet de la totalité des souches de bactéries anaérobies non-MOT reçues ou isolées, en deuxième intention et en parallèle des méthodes classiques d'identification et de typage validées (ie séquençage de type Sanger du gène codant l'ARN ribosomal 16S, mais

aussi de gènes de ménage comme dnaK, rpoB, cpn-60... en plus des tests standards de bactériologie anaérobie).

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 le MOT et les personnels ont été autorisés par l'ANSM. Depuis 2019, le séquençage des génomes de *Clostridium botulinum* est fait 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 génomes de *Clostridium botulinum* ont été séquencés avec succès.

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	Plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) sur le campus de l'Institut Pasteur
	Illumina sur NextSeq 500

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI) de L'Institut Pasteur
	BioNumerics et logiciels « maison »

Le CNR utilise la suite CLC Genomics Workbench et le logiciel BioNumerics v7.6 pour l'analyse des séquences et la recherche des gènes d'intérêt. Des outils maison sont également utilisés pour réaliser certaines recherches (récupération des gènes codant pour les ARN 16S, 5S et 23S ; récupération des gènes d'intérêt (codant pour des toxines, des résistances aux antibiotiques ; réorganisation des contigs le long d'un génome de référence).

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
☐ NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
☒ OUI	Investigations d'épidémies : notamment cas de botulisme et TIAC à <i>Clostridium perfringens</i> ou à <i>Bacillus cereus</i>

Depuis 2014, tous les génomes des souches de *Clostridium botulinum* isolées des prélèvements biologiques, alimentaires ou environnementaux sont systématiquement entièrement séquencés pour chaque foyer de botulisme humain à des fins d'investigations de l'épidémie. D'autres souches de *Clostridium botulinum* issues de foyers plus anciens ou d'autres sources sont également séquencées à des fins épidémiologiques et de surveillance/connaissance des souches circulant en France.

Nous avons régulièrement recours au séquençage génomique de souches de *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* et *Bacillus cytotoxicus* dans le cadre d'investigations de TIAC.

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

Analyse bio-informatique effectuée en complément d'analyses phénotypiques et moléculaires :

- Identification : calcul du score ANI à l'aide de script interne
- Analyse phylogénétique : scripts internes
- Resistome : Resfinder et Bionumerics
- Extraction des gènes d'intérêt (de toxine, de virulence...) : scripts internes et BioNumerics.

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

6 souches de *Clostridium perfringens* isolées de TIAC

10 souches de *Clostridium botulinum* isolées des foyers suivis en 2024

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

185

Aucune sélection : toutes les souches sont séquencées à des fins de surveillance

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

Les data (brutes et analysées) sont stockées dans les serveurs sécurisés gérés par la DSI de l'Institut Pasteur.

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Les séquences ne sont pas partagées sauf en cas de publication.

3. Activités de surveillance

Éléments clefs 2024 en termes de surveillance :

8 foyers de botulisme alimentaire ont été diagnostiqués
un cas de botulisme infantile
5 suspicions de botulisme iatrogène
6 foyers de botulisme animal.

9 TIAC à *Clostridium perfringens* confirmées

3.1 Description du réseau de partenaires

➤ Réseau de partenaires en bactériologie anaérobie (*hormis Clostridioides difficile*)

Les souches nous sont adressées par l'intermédiaires des laboratoires hospitaliers ou laboratoires d'analyses privés pour confirmation d'identification, vérification de l'antibiogramme et/ ou recherche des mécanismes de résistance. La répartition des partenaires s'étend sur toute la France. L'établissement d'un réseau d'hospitaliers pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries appartenant au groupe *Bacteroides fragilis* a débuté en décembre 2023 par l'intermédiaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et du Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des hôpitaux (Col.BVH).

➤ 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. Certaines demandes d'analyse de botulisme proviennent de l'étranger (Suisse).

Lors d'alerte de 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, ANSES, ANSM) y compris 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.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

➤ Surveillance en bactériologie anaérobie (*hormis Clostridioides difficile*)

Le CNR a reçu 168 souches bactériennes pour identification et/ou toxinotypage et/ou détermination de la résistance aux antibiotiques, 23 prélèvements pour recherche de pathogènes spécifiques, et a isolé 27 souches de prélèvements pathologiques reçus au CNR à des fins diagnostiques.

Souches et prélèvements d'origine humaine : 139 souches et 5 prélèvements

Genre (nombre)	Espèce (nombre)
<i>Actinomyces</i> (2)	<i>gerencseriae</i> (1), <i>neuii</i> (1)
<i>Alistipes</i> (1)	<i>communis</i> (1)
<i>Anaerococcus</i> (3)	<i>degeneri</i> (2), <i>provencensis</i> (1)
<i>Bacteroides</i> (42)	<i>caccae</i> (1), <i>faecis</i> (1), <i>fragilis/hominis</i> (20), <i>humanifaecis</i> (1), <i>koreensis</i> (1), <i>ovatus</i> (1), <i>pyrogenes</i> (1), <i>thetaiotaomicron</i> (15), <i>xylanisolvans</i> (1)
<i>Clostridoides</i> (1)	<i>mangenotii</i> (1)
<i>Clostridium</i> (37)	<i>argentinense</i> (1), <i>baratii</i> (1), <i>butyricum</i> (5), <i>innocuum</i> (1), <i>moniliforme</i> (1), <i>perfringens</i> (20), <i>septicum</i> (2), <i>tepidum</i> (1), <i>tetani</i> (3) et <i>sp.</i> (1)
<i>Cutibacterium</i> (5)	<i>acnes</i> (5)
<i>Desulfovibrio</i> (1)	<i>desulfuricans</i> (1)
<i>Dialister</i> (1)	<i>micaerophilus</i> (1)
<i>Enterocloster</i> (1)	<i>clostridioformis</i> (1)
<i>Faecalicatena</i> (1)	<i>contorta</i> (1)
<i>Fingoldia</i> (2)	<i>mania</i> (2)
<i>Fusibacterium</i> (3)	<i>necrophorum subsp. funduliforme</i> (2), <i>vincentii</i> (1)
<i>Lacrimispora</i> (1)	<i>indolis</i> (1)
<i>Morganella</i> (1)	<i>morganii</i> (1)
<i>Paeniclostridium</i> (1)	<i>sordellii</i> (1)
<i>Parabacteroides</i> (6)	<i>distasonis</i> (6)
<i>Parvimonas</i> (2)	<i>micra</i> (2)
<i>Phocaeicola</i> (4)	<i>dorei</i> (2), <i>vulgatus</i> (2)
<i>Prevotella</i> (9)	<i>bivia</i> (6), <i>disiens</i> (1), <i>massiliensis</i> (1), <i>melaninogenica</i> (1)
<i>Turicibacter</i> (2)	<i>sanguinis</i> (2)
<i>Veillonella</i> (6)	<i>hominis</i> (2), <i>infantum</i> (1), <i>parvula</i> (2), <i>rogosae</i> (1)
<i>Winkia</i> (1)	<i>neuii subsp. anitrata</i> (1)
Présence de <i>Clostridium perfringens</i> et de <i>Bacillus cereus</i> dans le prélèvement (2)	
Souche non repartie en sub-culture (5)	
Souche contaminée (3)	
Absence de <i>Clostridium tetani</i> dans le prélèvement (1)	
Absence de <i>Clostridium perfringens</i> dans le prélèvement (1)	

La souche de *Clostridium sp.* a une ANI <95% avec les souches types de *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tepidum* et *Clostridium botulinum*.

Souches et prélèvements d'origine vétérinaire : 3 souches et 14 prélèvements

Espèce	Nombre
<i>Clostridium perfringens</i>	1
<i>Clostridium colinum</i>	1
<i>Bacteroides pyrogenes</i>	1

En plus de ces souches, le CNR a reçu 14 prélèvements (caecum, foie, encéphale ou muscle) pour la recherche de [*Clostridium*] *colinum*, *Clostridium chauvoei* et autres *Clostridii*.

Souches et prélèvements d'origine alimentaire : 7 souches et 1 prélèvement

Espèce	Nombre
<i>Clostridium perfringens</i>	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1
<i>Clostridium butyricum</i>	1
<i>Clostridium sporogenes</i>	1
Identification discordante de la demande (<i>Enterococcus durans</i>)	1

Le CNR a également isolé à partir des différents prélèvements reçus pour expertise 27 souches dont 17 souches de *Clostridium botulinum* impliquées dans les cas de botulisme alimentaire, infantile et vétérinaire.

➤ Surveillance du botulisme

Botulisme humain :

En 2024, le CNR a procédé au diagnostic biologique du botulisme humain à partir de 217 échantillons de sérum et 160 échantillons de selles ou d'écouvillons rectaux.

Huit foyers de botulisme alimentaire ont été confirmés, représentant un total de 14 patients.

Le botulisme alimentaire reste la forme la plus fréquente, avec 4 foyers de type A, 3 foyers de type B et un de type bivalent AB (Tours) (cf tableau récapitulatif).

Un cas de botulisme infantile a été diagnostiqué, en 2024, de type AB.

Le nombre de foyers de botulisme en France au cours de ces dernières années est relativement constant : entre 7 et 9 foyers depuis 2018 tout comme le nombre de patients : entre 11 et 15 depuis 2018.

Le CNR a reçu 8 sérums pour diagnostic de botulisme iatrogène sans confirmation. Le diagnostic de ce type de botulisme est un enjeu pour l'avenir via peut-être par la méthode Endopep SIA pour la recherche de toxines botuliques (cf. chapitre travaux de recherche).

Recherche et titrage d'anticorps anti-toxine botulique A :

En 2024, le CNR a décidé, faute de résultats probants, d'arrêter cette analyse.

Botulisme animal :

En 2024, le nombre de prélèvements reçus (47) pour le diagnostic du botulisme animal est beaucoup plus faible que les années précédentes.

3 foyers ont été confirmés : 1 foyer de type C/D, 1 foyer de type D/C et un sérum de dindon a été trouvé positif à du botulisme de type E.

Botulisme agroalimentaire et environnemental :

226 échantillons d'aliments ont été envoyés au CNR pour une recherche de toxine botulique ou de *Clostridium botulinum* : 205 de la part d'industriels (tous négatifs) et 21 dans le cadre d'enquêtes alimentaires à la suite des cas de botulisme humain.

3 prélèvements environnementaux ont été également envoyés par des industriels.

Foyers et cas de botulisme humain Période du 01/01/2024 au 31/12/2024						
Cas	Mois	Foyer	Nb de cas	Dossier	Autres prélèvements biologiques	Remarques
1	Avril	TOURS Botulisme infantile type AB	1	2024/00275: sérum 2024/00276 Selles	Miel : négatif (2024/00287)	Prélèvement de suivi 2024/00324 Selles Toujours positif en toxine et CB 2024/00351 (selles) 2024/00405 (selles)
2	Juin	EPINAL Botulisme alimentaire type A	2	2024/00462 Sérum 2024/00463 Sérum	Selles 2024/00482 Selles 2024/00485 selles 2024/00488 (NC même selles que précédent) Conserve 2024/00498 à 2024/00513	Restes alimentaires jetés et non récupérables (compost). Envoi par la DDPP de conserves non consommées et retrouvées au domicile des patients par leur fille. Aliment suspect : conserve de betteraves maison, mais conserve consommée au compost, et autres conserves testées négatives
3	Juin	CHALONS EN CHAMPAGNE Botulisme alimentaire type B	1	2024/00491 Serum	Conserve sanglier 2024/00495 Conserve sanglier 2024/00496	Aliment suspect conserve de sanglier de préparation familiale consommée le 11/06/24.
4	Septembre	TOURS Botulisme alimentaire type AB	5	2024/00714 ail des ours 2024/00716 sérum 2024/00717 sérum 2024/00718 sérum 2024/00719 sérum 2024/00720 sérum 2024/00721 selles 2024/00722 selles 2024/00723 selles 2024/00724 selles 2024/00725 selles	2024/00732 sérum 2024/00733 selles 2024/00734 sérum 2024/00735 selles 2024/00736 conserve pesto 2024/00737 selles 2024/00738 conserve pesto 2024/00749 conserve pesto 2024/00750 conserve pesto 2024/00802 sérum (NC) 2024/00803 sérum 2024/00804 selles 2024/00805 selles	Conserve artisanales vendues sur le marché Ail des ours
5	Septembre	CHARLEVILLE-MIEZIERE Botulisme alimentaire type A	1	2024/00811 sérum 2024/00812 selles	2024/00859 sérum	
6	Octobre	NANTES Botulisme alimentaire type A	1	2024/00868 sérum 2024/00895 selles	2024/00893 plat cuisiné	Plat cuisiné "Pâtes Gambas" industriel
7	Octobre	NIORT Botulisme alimentaire type B	2	2024/00889 sérum 2024/00904 sérum		jambon / pâté artisanal
8	Octobre	GRENOBLE Botulisme alimentaire type A	1	2024/00945 sérum 2024/00946 pâté		pâté artisanal
9	Décembre	RENNES Botulisme alimentaire type B	1	2024/01043 selles 2024/01044 sérum 2024/01045 sérum		voyage portugais
						2024/00492 isolée de 2024/00482 (selles) 2024/00493 isolée de 2024/00485 (selles) 2024/00524 isolée 2024/00496 (conserve) 2024/00743 isolée 2024/00714 2024/00840 isolée 2024/00804 2024/00900 isolée 2024/00893 2024/00901 isolée 2024/00895 2024/00958 isolée 2024/00946 2025/00001 isolée 2024/01043

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

Depuis septembre 2019, le CNR réalise un antibiogramme de manière systématique à la réception ou à l'isolement d'une souche suite à l'augmentation des demandes par les laboratoires, particulièrement pour le genre *Bacteroides*. En effet, certaines espèces se montrent de plus en plus résistantes aux antibiotiques.

Durant l'année 2024, le CNR a donc analysé 103 souches bactériennes d'origine humaine envoyées par les laboratoires, 3 souches vétérinaire, 5 souches alimentaires et 7 souches autres. A ceci se rajoutent les 68 souches isolées par le CNR à partir d'échantillons reçus.

Toutes les souches reçues ou isolées au CNR n'ont pas bénéficié d'un antibiogramme, certaines d'entre elles ayant été transmises pour un toxinotypage.

Le CNR ne recevant que les souches avec un profil de résistance particulier ou impliquées dans un contexte clinique particulièrement grave ou peu commun, aucune estimation de prévalence de résistance n'est réalisée. Les données d'antibiorésistance sont décrites ci-dessous.

Genre *Bacteroides* (47) :

Sur les 47 souches du genre *Bacteroides* étudiées :

Six souches sont résistantes au métronidazole, toutes porteuses d'un gène *nim* (A, E ou J). Toutes les souches sensibles sont négatives pour la recherche de *nim*.

Concernant les beta-lactamines, 23 souches sont résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique, et 14 sont résistantes également à la pipéracilline-tazobactam. Plusieurs souches ont été envoyées au CNR pour étudier une discordance entre l'amoxicilline-acide clavulanique (sensible) et la pipéracilline-tazobactam (résistant). Si les résistances à la pipéracilline-tazobactam n'ont pas été confirmées au CNR, il est évident que le diamètre de la pipéracilline-tazobactam est largement diminué par rapport à l'amoxicilline-acide clavulanique (parfois de moitié), avec des CMI plus élevées pour la pipéracilline-tazobactam, mais qui restent catégorisées sensibles selon le CASFM. Ces phénomènes de discordance sont à surveiller.

11 souches de *Bacteroides fragilis* sensu stricto sont résistantes à l'ensemble des carbapénèmes (avec des CMI supérieures à 32 µg/mL), avec présence du gène *cfiA* en association avec des séquences d'insertion (IS) ou présence du gène *bla* OXA-347. Une souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* est également résistante à l'ensemble des carbapénèmes avec présence du gène *bla* OXA-347 et ainsi qu'une souche de *Bacteroides xylanisolvens* avec présence du gène *crxA* décrit en 2022. On observe de plus en plus de résistances non croisées aux carbapénèmes également, avec l'ertapénème étant le plus touché, et l'imipénème qui reste le moins atteint.

26 souches sont résistantes à la clindamycine, en grande majorité porteuses de gènes *erm*(F) et/ou *erm*(G), exceptés pour deux d'entre elles.

Une souche de *Bacteroides thetaiotaomicron* est résistante au linézolide et au chloramphénicol avec présence du gène *cfr*(C).

Douze souches sont résistantes à la moxifloxacine, 9 en lien avec une mutation en position 82 du gène *gyrA*.

Genre *Parabacteroides/ Phocaeicola* (11) :

Deux souches sont résistantes au métronidazole sans présence d'un gène *nim*.

Sept souches sont résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique, et deux à la pipéracilline-tazobactam. Une souche de *Parabacteroides distasonis* est résistante à la pipéracilline-tazobactam et sensible à l'amoxicilline-acide clavulanique. Une souche de *Phocaeicola dorei* est résistante à tous les carbapénèmes.

Cinq souches sont résistantes à la clindamycine avec présence du gène *erm(F)*.

Cinq souches sont résistantes à la moxifloxacine avec pour toutes une mutation en position 82 du gène *gyrA*.

Genre *Clostridium* (45) :

Le CNR a réalisé l'antibiogramme de 45 souches du genre *Clostridium*, 39 souches ne présentaient pas de résistance aux antibiotiques inclus dans la liste du CASFM.

Deux souches de *Clostridium perfringens* sont résistantes à la clindamycine avec présence du gène *erm(Q)*.

Quatre souches (3 *Clostridium butyricum* et 1 *Clostridium innocuum*) sont résistantes à la rifampicine. La souche de *Clostridium innocuum* est également résistante à la vancomycine (résistance naturelle).

Au niveau du toxinotypage des souches de *Clostridium perfringens*, pour la première fois en France, le CNR a détecté une souche porteuse de l'entérotoxine binaire codée par les gènes *becA* et *becB* décrite en 2014.

Trois souches de *Clostridium tetani* ont été reçues au CNR pour toxinotypage. 3 souches possédaient le gène *tetX* codant pour la toxine tétanique.

Genre *Prevotella* (11) :

Quatre souches sont résistantes au métronidazole. Cette situation étant de plus en plus fréquente, le CNR a contacté le Dr Veloo, au département de microbiologie médicale à l'université de Groningen aux Pays-Bas et ayant décrit le dernier gène *nim* (*nimK*). Le même phénomène est observé dans leur laboratoire, avec des souches résistantes au métronidazole, avec l'absence de mécanisme de résistance connu au séquençage qui pourrait expliquer cette résistance

Deux souches sont résistantes à la clindamycine, avec présence du gène *erm(F)*.

Quatre souches sont résistantes à la moxifloxacine, et deux autres ont des CMI limites supérieures.

Toutes les souches sont sensibles à la tigécycline, linézolide, rifampicine, chloramphénicol, carbapénèmes et pipéracilline - tazobactam.

3.4 :Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

La situation épidémiologique du botulisme fait l'objet d'une mise au point régulière avec Santé publique France, avec pour principal interlocuteur Mme Nathalie Jourdan da Silva. 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.

Contribution aux réseaux de surveillance européens et international :

Notre laboratoire est régulièrement sollicité pour le diagnostic et la surveillance du botulisme dans les DROM comme La Réunion et Mayotte, et de plus en plus fréquemment dans d'autres pays européens (Suisse, Portugal, Espagne), l'Amérique du Sud, d'Afrique du Nord et l'Arabie Saoudite. Depuis août 2018, à la demande des autorités de santé suisse, le CNR réalise de façon formelle le diagnostic biologique de botulisme humain pour la Suisse, et s'est engagé à signaler les cas sur leur plateforme dédiée.

Christelle Mazuet est membre du comité de nomenclature des types et sous-types de toxines botuliques coordonné par le CDC d'Atlanta.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Sans objet

4. Alertes

Les bactéries anaérobies ne sont généralement pas à l'origine de phénomènes épidémiques. Hormis le botulisme (maladie à déclaration obligatoire) et les infections sévères ou épidémiques à *C. difficile*, il n'y a donc pas de procédure d'alerte pour les affections à bactéries anaérobies.

Botulisme : chaque cas de botulisme confirmé biologiquement par le CNR a fait l'objet d'une déclaration par email ou téléphone à Santé publique France (SpF). En outre, le CNR a eu régulièrement des contacts téléphoniques ou par courrier électronique avec SpF, les ARS, la DGAL et les cliniciens pour faire le point sur les foyers de botulisme en cours et sur des suspicions de botulisme. L'alerte est déclenchée lorsqu'il y a un risque de santé publique, notamment avec un produit alimentaire du commerce.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Site web du CNR :

<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme>

Le CNR des Bactéries anaérobies et botulisme a mis à disposition) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostic différentiel de neuropathies de type paralysie flasque, pré analytiques, interprétation des résultats) :

- des numéros de téléphone (01 45 68 84 56 / 01 45 68 83 10)

- des adresses email (christelle.mazuet@pasteur.fr , gauthier.delvallez@pasteur.fr , laure.diancourt@pasteur.fr et cnranaerobies@pasteur.fr)

Des cahiers d'enregistrement/traçabilité/transmission des prestations de conseils délivrées aux professionnels de santé, vétérinaires, industriels, particuliers ont été mis en place à chaque poste téléphonique.

Ainsi durant l'année 2024, le CNR a répondu à un nombre de mails et d'appels téléphoniques équivalent à 2023.

Le CNR a participé au webinaire, intitulé Botulisme(s) organisé par la Société Française de Microbiologie le 5 février 2024 :

Regards croisés : botulismes animal et humain

C. Le Maréchal (Anses) & **G. Delvallez** (Pasteur Paris)

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Christelle Mazuet, Gauthier Delvallez et Laure Diancourt ont été régulièrement en contact avec Nathalie Jourdan Da Silva et Alexandra Mailles pour l'investigation des suspicions de botulisme.

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

Plusieurs communications dans des médias grand public ont été réalisées à la suite des cas de botulisme à Tours

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

ANR CLOSTABAT («Characterization of the *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses ») (Dr O. FIRMESSE, département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments, 2022-2025)

Clostridium perfringens et *Clostridioides difficile* sont des bactéries pathogènes majeures impliquées dans les infections humaines. *C. perfringens* est de plus l'un des dangers bactériens identifiés dans les Guides de Bonnes Pratiques d'Hygiène et d'application des principes HACCP du maillon abattage-découpe des filières bovine, porcine et volaille. Les animaux étant porteurs sains de ces deux espèces dans leur tube digestif, les viandes animales sont des cibles privilégiées pour expliquer la survenue d'épisodes toxiques impliquant ces pathogènes.

Sans que l'adéquation et la pertinence des mesures de maîtrises mises en place en abattoir et en découpe ne soient remises en cause, peu ou pas de données sont aujourd'hui disponibles en France sur l'importance de ces deux dangers au maillon abattoir et atelier de découpe. Le projet ClostAbat réunit des partenaires académiques et des instituts techniques avec un large éventail de compétences en sciences des aliments et en clinique humaine afin de développer des connaissances et des outils d'aide à la décision pour permettre aux filières d'avoir une information objective sur l'importance de ces dangers en abattoirs/ateliers de découpe.

Ce projet de recherche vise à évaluer la contamination des élevages de bovins, volailles et porcins 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 des anaérobies 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.

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.

Le CNR ne disposant ni des autorisations ANSM ni d'un Bioplex nécessaires à la mise en place d'un tel projet, 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. Le retour d'expérience de ces essais a eu lieu en mai 2025 et de nouveaux essais sont programmés fin 2025. Le CNR souhaite, par la suite, acquérir le matériel nécessaire et obtenir les autorisations nécessaires afin de développer cette méthode.

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

Projet dans le cadre de la thèse de Doctorat de Gauthier Delvallez, réalisée au CNR au sein du Laboratoire Pathogénèse des Bactéries Anaérobies et sous la direction de Bruno Dupuy.

Le groupe *Bacteroides fragilis* (BFG) regroupe un ensemble d'environ 30 espèces bactériennes de diversité génétique variée. Il est réparti en 3 genres : *Bacteroides*, *Parabacteroides*, et *Phocaeicola*. Les BFG sont des commensaux de la flore digestive mais présentent un risque infectieux dans la majorité des cas lors d'une rupture de la barrière intestinale. Le manque de données des profils de résistance aux antibiotiques des espèces du BFG est principalement due à : i) l'absence d'antibiogramme (AST) en systématique (ou panel restreint d'antibiotiques pour les infections invasives), ii) l'absence de consensus international depuis plusieurs années, et iii) l'absence de déclaration obligatoire des résistances atypiques et/ou des souches multirésistantes (MDR). Il est donc aujourd'hui difficile d'établir les tendances de résistance chez BFG pourtant nécessaires afin de surveiller l'émergence des souches MDR et de définir les traitements à utiliser.

Dans ce contexte les objectifs de ce travail sont multiples :

- Faire un état des lieux de la résistance aux antibiotiques chez BFG et suivre les émergences actuelles.

Une mise à jour des données sur la prévalence des résistances au sein du BFG a été réalisée en collaboration avec des laboratoires hospitaliers présents en Ile-de-France et répartis sur le territoire. Une analyse rétrospective sur une période définie des données d'AST des souches de BFG isolées a permis de faire un état des lieux des niveaux de résistance sur un grand nombre de souches et dans plusieurs régions de France.

Le résultat de ce travail a été présenté sous forme de poster lors du congrès de la SFM qui a eu lieu en octobre 2024 :

Prevalence of species and antibiotic resistance within the *Bacteroides fragilis* group: national multicentre survey in France, 2022-2023

Delvallez G, Alauzet C, Diancourt L, Mazuet C, Barbut F, Marchandin H, Dupuy B, on behalf of the BFG AMR Collaborative Study group

Les souches présentant des profils de résistance particuliers et les souches MDR ont été envoyées au CNR. Ce travail permet d'enrichir la collection actuelle de souches MDR du CNR (soit environ 80 souches sur la période 2017-2022) et de réaliser une étude plus descriptive de ces souches par i) la réalisation d'AST sur un panel élargi d'antibiotiques, ii) le séquençage complet des souches pour l'identification d'espèce et des gènes de résistance décrits, et iii) l'analyse phylogénétique des souches pour détecter l'existence d'éventuels clusters.

- Optimiser les outils de détection des résistances pour améliorer la surveillance :

Pour faciliter la récupération de données génétiques des souches BFG au niveau national et international, l'implémentation d'une base de données génomiques partagée et accessible en ligne (BIGSdb) sera alimentée en premier lieu par les souches disponibles au CNR, par les souches hospitalières récupérées lors de la première partie du projet, puis par celles des laboratoires de recherche ou des laboratoires cliniques au niveau national, européen et/ou mondial. Cet outil permettra de mettre en place un schéma d'identification d'espèces à partir du core-genome (cg) MLST comme ressource taxonomique, et d'être utilisé par les laboratoires déposant leurs génomes pour réaliser des études de génomique comparative afin de rechercher et cibler des gènes d'intérêt, avec notamment un module lié aux gènes connus de résistance aux antibiotiques.

L'ensemble des données phénotypiques et génomiques obtenues en première partie de ce travail permettra une approche pangénomique de type GWAS (Genome Wide Association Study) pour analyser les variations génétiques chez un nombre important de souches de BFG que l'on cherchera à corréler avec les caractères phénotypiques de

résistance des souches. Nous nous intéresserons en particulier à la résistance non croisée aux beta-lactamines (amoxicilline-acide clavulanique, ampicilline-sulbactam, pipéracilline-tazobactam, imipénème, ertapénème, méropénème), sachant que de plus en plus de souches isolées de BFG seraient résistantes à la pipéracilline-tazobactam et sensibles à l'amoxicilline/acide clavulanique, principalement chez *B. thetaiotaomicron* et *B. faecis*.

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

***Clostridium neonatale* antimicrobial susceptibility, genetic resistance determinants, and genotyping: a multicentre spatiotemporal retrospective analysis.**

Ferraris L, Delannoy J, **Mazuet C, Diancourt L**, Mesa-Schein V, Barbut F, Aires J. J Antimicrob Chemother. 2024 Feb 1;79(2):271-279. doi: 10.1093/jac/dkad369. PMID: 38084883 Free PMC article. PMID: 38084883

Binary Enterotoxin Producing *Clostridium perfringens* Isolated in Blood Cultures: Case Report and Review of the Literature.

Ben Saïd L, **Diancourt L**, Rabeau A, Gallet V, **Delvallez G**, Grare M. Microorganisms. 2024 May 28;12(6):1095. doi: 10.3390/microorganisms12061095. PMID: 38930477 Free PMC article. PMID: 38930477

Genomic study of European *Clostridioides difficile* ribotype 002/sequence type 8.

Dost I, Abdel-Glil M, Persson S, Conza KL, Oleastro M, Alves F, Maurischat S, Scholtzek A, **Mazuet C, Diancourt L**, Tenson T, Schmoock G, Neubauer H, Schwarz S, Seyboldt C. Microb Genom. 2024 Jul;10(7):001270. doi: 10.1099/mgen.0.001270. PMID: 39051872 Free PMC article. PMID: 39051872

An outbreak of botulism on a pig farm due to the newly described *Clostridium botulinum* type C.

Le Maréchal C, Denis M, Vanlemmens L, Jambou L, **Delvallez G**, Poezevara T, Abed-Zahar M, **Diancourt L**, Baudouard MA, Eveno E, Bayon-Auboyer MH, Fellag M, Rouxel S, Amenna N, **Mazuet C**, Guéguen JM, Rose N. Anaerobe. 2024 Oct;89:102885. doi: 10.1016/j.anaerobe.2024.102885. Epub 2024 Jul 24. PMID: 39059624 PMID: 39059624

Comment on: Co-occurrence of the cephalosporinase *cepA* and carbapenemase *cfiA* genes in a *Bacteroides fragilis* Division II strain: an unexpected finding.

Delvallez G, Diancourt L, Guglielmini J, Michon AL, Brisse S, Dupuy B, Criscuolo A. J Antimicrob Chemother. 2025 Feb 3;80(2):598-600. doi: 10.1093/jac/dkae427. PMID: 39657152

Diagnosis of ulcerative enteritis in partridges: preliminary results of the evaluation of a PCR-based tool.

Viloux N, **Delvallez G**, Bourgeois C, **Sautereau J, Mazuet C**, Souillard R, Vove A, **Diancourt L**, Le Maréchal C. Animal - Science Proceedings 15 (2024) 191–259. doi: 10.1016/j.anscip.2024.06.053.

Botulisme humain et animal: regards croisés.

Delvallez G, Mazuet C, Le Maréchal C. Revue de Biologie Médicale (379, Juillet-Aôut 2024, p. 41-49). doi: 10.3917/rbm.379.0041.

Bilan du diagnostic du botulisme bovin en laboratoire en France en 2022: 35 foyers confirmés.

Le Maréchal C, **Diancourt L**, Le Men M, Jambou L, Bayon-Auboyer MH, Poezevara T, Baudouard MA, Rouxel S, Abed-Zahar M, **Delvallez G**, Amenna-Bernard N, Chemaly M, **Mazuet C**. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation 101(1) :1-8. 2024.

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

Nous coopérons activement et efficacement 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. Il faut souligner ici la difficulté que nous rencontrons à échanger simplement, rapidement et à moindre coût des prélèvements, souches et ADN du fait de la réglementation MOT/ANSM.

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.

Nous collaborons également régulièrement et plus facilement que par le passé avec l'unité SBCL (Staphylococcus, Bacillus & Clostridium) du laboratoire de sécurité des Aliments de l'ANSES-Maison Alfort :

- Lors de l'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.

- 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 »).

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Méthode Endopep SIA pour la recherche de toxines botuliques

Le CNR va faire une demande de budget afin d'obtenir les équipements nécessaires à la mise en place de cette technique, d'abord à des fins de recherche et en fonction des résultats obtenus pour répondre au diagnostic des botulismes iatrogènes.

En parallèle, le CNR est en relation avec la DGA/MNRBC pour développer un projet en collaboration avec l'Ecole Polytechnique pour la mise en place d'un diagnostic sur culture cellulaire.

ANR CLOSTABAT («Characterization of the *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses ») (Dr O. FIRMESSE, département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments, 2022-2025)

Fin du projet en fin d'année 2025

Programme NRBC-E « Projet H20 »

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 va 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.

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.

8.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme (CNRAB) 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 CNRAB 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.

8.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Effectif 2024 du CNR en Equivalent Temps Plein (ETP) et financement :

Fonctions	ETP réels	Financement
Scientifique	1	Institut Pasteur & SpF
Cadre medical	1	Institut Pasteur & SpF
Ingénieur	0,8	Institut Pasteur & SpF
Technicien(ne)s supérieur(e)s IP	2	Institut Pasteur & SpF
Agent technique	1	Institut Pasteur
Administratif	0,5	Institut Pasteur & SpF

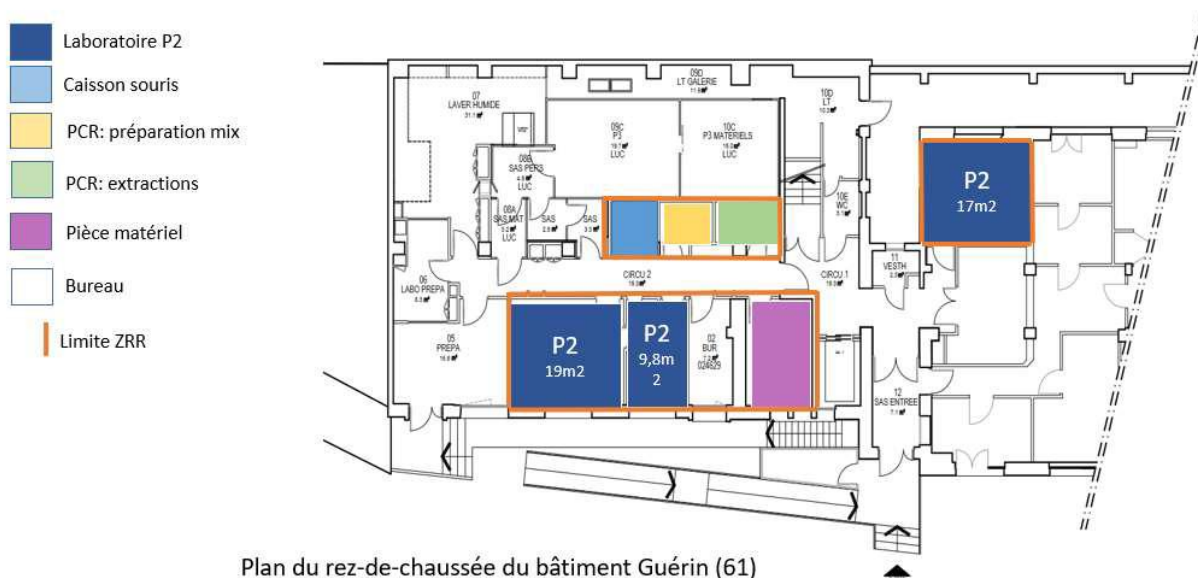
8.3 Locaux et équipements

➤ Locaux

Les locaux hébergeant le CNR ont été redéfinis en 2018. L'ensemble des activités est maintenant regroupé au RDC du bâtiment Guérin (61). Des travaux de déménagement/réaménagement ont été réalisés fin 2019 dans un nouveau

laboratoire P2 attribué au CNR (cf plan ci-dessous). De nouveaux travaux de réaménagement ont été réalisés en 2023 suite à l'attribution au CNR de nouveaux bureaux, permettant de libérer une pièce au rez-de-chaussée et de créer un nouveau laboratoire P2, facilitant la réception et la prise en charge des échantillons. Ces locaux comprennent :

- 2 espaces bureaux : 1 espace de 7,5 m² au rez-de-chaussée, et un deuxième espace de 18,5 m² au 1er étage.
- un laboratoire P2 de 19 m² qui contient un PSM de type II, servant à la prise en charge des prélèvements après culture.
- un laboratoire P2 de 9,8 m² qui contient un PSM de type II, servant à la prise en charge des prélèvements le jour de leur arrivée au CNR.
- une pièce "matériel" de 11 m² renfermant, un appareil Anoxomat pour le remplissage des jarres avec les mélanges gazeux pour l'anaérobiose, un incubateur à 37°C, une sorbonne, des thermocycleurs, électrophorèses d'ADN et un combiné réfrigérateur/congélateur,
- une pièce avec un caisson souris réservée aux injections de souris pour le diagnostic du botulisme,
- une pièce réservée à la préparation des mix PCR avec une hotte PCR et un congélateur,
- Une pièce d'extraction d'ADN
- une pièce (17 m²) réservée à la PCR de diagnostic du botulisme, à la préparation et au stockage des toxines et aux activités de recherche de développement. Ces activités n'étant pas compatibles simultanément, une nécessaire dissociation temporelle est mise en place, l'activité de diagnostic restant toujours prioritaire.



➤ Equipements

Les équipements ont été redistribués en 2018. Le CNR ne dispose plus pour le moment d'équipement de culture cellulaire ni de chaîne ELISA. Les équipements de base nécessaires et indispensables à court terme aux activités de diagnostic ont été préservés.

Equipements de base pour la bactériologie anaérobie :

Equipements de base de bactériologie standard

Jarres anaérobies et système de remplissage avec des mélanges gazeux (Anoxomat, Mart system)

Enceinte anaérobie

Postes de sécurité microbiologique (PSM) de type II
Enceinte climatique à 35°C
Microscope
Centrifugeuses
Bains-marie et blocs chauffants
Réfrigérateurs, congélateurs (-20°C, -80°C)
Container d'azote liquide pour la conservation des souches de référence et des isolats

Equipement de biologie moléculaire dont notamment :

appareils d'amplification génique : PCR standard et PCR-temps réel. Hotte à PCR
cuves d'électrophorèse et générateurs
Lecteur analyseur d'image (GelDoc 2000, BioRad).
séquençage d'ADN.
1 spectrophotomètre Nanodrop (Labtech)

Equipement de biochimie :

- système d'analyse des protéines (électrophorèse en gel de polyacrylamide, transfert sur membrane et détection immunologique)

Animalerie :

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

➤ **Locaux, matériel, équipements, moyens extérieurs à la structure, mais disponibles pour elle sur le campus (animaleries, séquenceurs, etc...) et nécessaires aux missions du CNR**

Laboratoire de préparation commun aux autres unités hébergées dans le bâtiment
Animalerie lapins pour la production d'anticorps spécifiques anti-toxines botuliques
Plateformes techniques du campus de l'Institut Pasteur
P2M (Séquenceur automatique d'ADN et bio-informaticiens), Pôle PGP de la CIBU pour le séquençage des MOT,
Plateforme de protéines recombinantes.

8.4 Collections de matériel biologique

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 38 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.

8.5 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 14. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

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

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

la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QEDD) qui apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)

la Direction de la Recherche Médicale ;

et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

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

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC (<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>).

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

8.6 Liste des techniques de référence

-Test de détection, d'identification et de typage des neurotoxines botuliques par le test de létalité sur souris (Accréditée par le COFRAC)

- Identification des gènes de neurotoxines botuliques A, B, E, F, C, C/D, D et D/C par PCR temps réel (Accréditée par le COFRAC).

- Identification des gènes de toxines alpha et CPE de *Clostridium perfringens* par PCR temps réel
- Identification des gènes de toxines Hbl, Nhe, Ces et CytK1 de *Bacillus cereus* par PCR temps réel
- Identification bactérienne par l'amplification des gènes codant les ADN ribosomaux 16S et séquençage Sanger
- Test de susceptibilité aux antibiotiques en milieu gélosé et en microdilution selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

Liste des marqueurs épidémiologiques :

Couples d'amorces pour identifier les gènes de toxines et flagellines suivants :

- 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, thêta, cytotoxine TpeL, netB. Confirmation de la délétion du gène de la toxine thêta à l'aide d'une PCR spécifique. 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*

Couples d'amorces pour autres gènes d'intérêt :

- Gènes de l'espace intergénique ARNr 16S – 23S
- Gènes de ménage hsp60, hsp70 et recA
- Gènes de sporulation
- Gènes de résistance aux antibiotiques [métronidazole ; β -lactamines (gènes cepA, cfxA et cfiA, séquences d'insertion IS 942, IS1186, ISBF417) chez *Bacteroides* du groupe *fragilis*.

8.7 Liste des techniques recommandées par le CNR

Sans objet

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

Cf PDF Annexe 3 CNR

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

Cf PDF Annexe 4 CNR

LIVRET 2 :

Laboratoire associé

Clostridioides difficile

Pr Frédéric Barbut

Saint Antoine, AP-HP

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
 1. Missions et organisation du CNR	6
Organigramme	6
Mission et Organisation.....	6
Démarche Qualité	6
 2. Activités d'expertise	7
2.1 Evolution des techniques	7
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	7
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	7
2.4 Collections de matériel biologique	7
2.5 Activités d'expertises	8
2.6 Activités de séquençage	9
2.7 Partage de séquences produites par les CNR.....	11
 3. Activités de surveillance	12
3.1 Description du réseau de partenaires	12
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	12
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	19
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	21
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	21
 4. Alertes	23
 5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	25
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	25
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	27
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	27
 6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	28
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	28
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	34

8. Programme d'activité pour les années suivantes	43
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	45
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	45
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	45
1.3 Locaux et équipements	45
1.4 Collections de matériel biologique	47
1.5 Démarche qualité du laboratoire	47
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	47
2.1 Liste des techniques de référence	47
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	48
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	49
3.1 Permanence du CNR	Erreur ! Signet non défini.
3.2 Autorisations MOT	Erreur ! Signet non défini.
3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale	Erreur ! Signet non défini.
3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo	Erreur ! Signet non défini.
3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France	Erreur ! Signet non défini.
3.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR	Erreur ! Signet non défini.
3.7 Autres remarques à destination du comité des CNR	Erreur ! Signet non défini.
4. Annexe 4 : Inventaire de la collection de matériel biologique	50

Résumé analytique

Faits marquants

Clostridioides difficile représente le principal entéropathogène responsable de diarrhées associées aux soins. Le laboratoire associé « *Clostridioides difficile* » a pour principales missions l'expertise et le développement des techniques d'identification et de typage, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux des souches de *Clostridioides difficile*. Le laboratoire contribue également à la surveillance des infections à *C. difficile* et participe à l'investigation des cas groupés.

Au cours de l'année 2024, **965** prélèvements ont été analysés, comprenant des souches humaines, animales et environnementales. Parmi les prélèvements humains, 498 ont permis d'isoler une souche de *C. difficile* toxigène ; 1% ont été identifiées comme appartenant au PCR ribotype 027. Les trois autres principaux PCR-ribotypes identifiés étaient le 106 (7,5%), le 002 (7,2%) et le 014 (6,2%).

L'année 2024 a été marquée par une forte augmentation de l'activité (+73,9% de prélèvements analysés). Dans la continuité de l'année 2023, l'année 2024 a permis de confirmer l'émergence du ribotype 638 impliqué dans différents clusters, et la diminution du nombre d'isolements de souches de ribotype 027.

Executive summary

Highlights

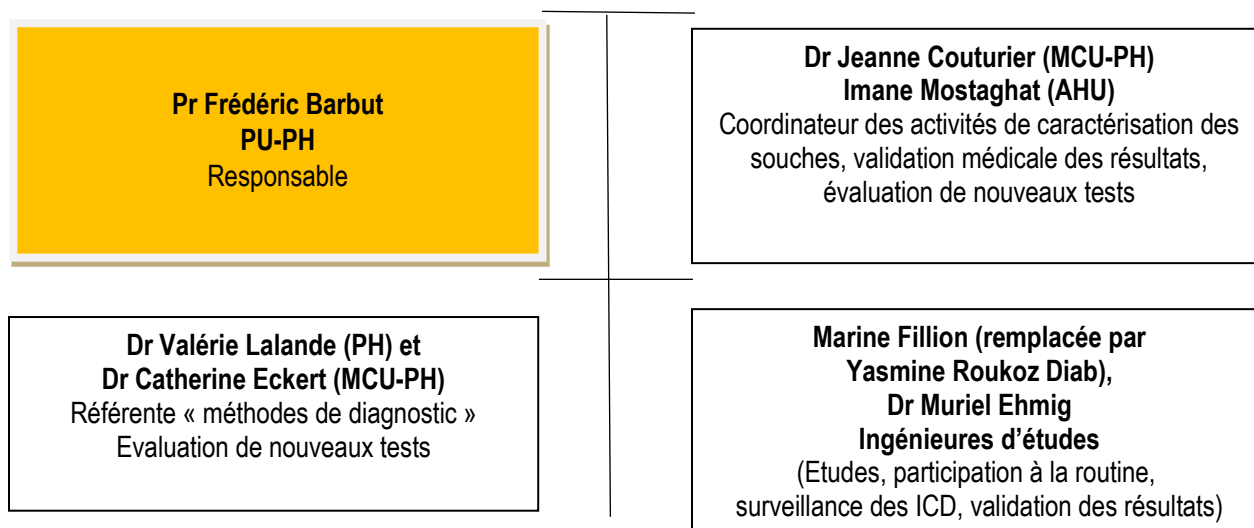
Clostridioides difficile is the major cause of healthcare-associated diarrhea. The main objectives of National Reference Laboratory (NRL) for "*Clostridioides difficile*" include the evaluation and development of new techniques for identifying and typing strains, and the evaluation of the susceptibility of *Clostridioides difficile* strains to antimicrobials. The laboratory also contributes to the surveillance of *C. difficile* infections and investigates outbreaks of *C. difficile* infection (CDI).

In 2024, **965** samples were analyzed by the National Reference Laboratory, including human, animal and environmental samples. Among human samples, 498 were positive with a toxigenic *C. difficile* strain; 1% were identified as PCR-ribotype 027. The three most predominant PCR-ribotypes were 106 (7.5%), 002 (7.2%) and 014 (6.2%).

This year has been characterized by a sharp increase of the number of strains analyzed (+73.9% of samples). We also confirmed the emergence of ribotype 638 which has been responsible of several clusters in different areas of France and the decrease of the number of the 027 strains.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme



L'année 2024 a été marquée par le remplacement de Marine Fillion (remplacée par Yasmine Roukoz Diab au 1er juin, puis par l'arrivée de Solweig Luce (technicienne) fin août.

Mission et Organisation

Sans objet : absence de changement majeur dans l'organisation du CNR.

Démarche Qualité

- Le laboratoire associé *C. difficile* est intégré au DMU BioGemH (APHP Sorbonne Université) qui est accrédité sur le management de la qualité selon la norme 15189 (site cofrac, N° accréditation 8-2542)
- Un contrôle externe de qualité (CEQ) a été réalisé en 2024, pour la dixième année consécutive, en collaboration avec le Centre National de référence en Belgique (Kate Soumillon). 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 2024 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 nos méthodes.

Activités d'expertise

Après l'adaptation de la technique de PCR-ribotypage selon les recommandations européennes de l'ECDC (Laboratory procedures for diagnosis and typing of human *Clostridium difficile* infection (europa.eu)) et utilisation du site Web-Ribo (<https://webribo.ages.at/>), les PCR-ribotypes sont identifiés de façon plus précise.

Les techniques et marqueurs disponibles, et la liste des techniques recommandées pour le laboratoire expert sont présentées en **annexe 2**.

Une page web est disponible sur le site du CNR pour informer les centres de santé (hôpitaux, laboratoires...) des modalités de fonctionnement du laboratoire associé et des procédures à suivre lors d'une infection à *C. difficile* (<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme/activites>).

Evolution des techniques

- Détermination de la sensibilité des souches à la fidaxomicine (méthodes de diffusion en milieu gélosé)
- Détermination de la CMI de la fidaxomicine en microplaques

Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

- Evaluation de 12 tests immuno-enzymatiques pour la détection de la glutamate déshydrogénase (GDH) et des toxines of *Clostridioides difficile* (commandes de l'AGEPS, APHP dans le cadre d'un appel d'offre)
- Evaluation du Standard M10 (Eurobio).

Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Néant

Collections de matériel biologique

=> Cf Annexe 4 pour 2024

Activités d'expertises

En 2024, nous avons analysé 965 prélèvements contre 555 en 2023, (+73,9%). Parmi ces prélèvements :

- 197 concernent des prélèvements de patients envoyés au CNR pour expertise (souches de routine),
- 485 concernent des selles de patients du GH AP-HP. Sorbonne Université (veille épidémiologique),
- 283 concernent des prélèvements divers (animal/environnement) adressés au CNR dans le cadre d'études spécifiques (ANR Clost'Abat, projet Clost'Envir).

Le **tableau I** présente le nombre de souches humaines reçues par le laboratoire associé en 2024 ainsi que les différentes caractérisations de ces souches. 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 2024, la durée médiane de restitution était de **8 jours**, et est stable par rapport à 2023. En 2024, plus de 39% des prélèvements reçus étaient des selles, des géloses profondes, des fécal swabs ou des biopsies, nécessitant des étapes supplémentaires pour isoler *C. difficile* en culture, entraînant ainsi une augmentation des délais entre la réception et le rendu des résultats.

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

Année	2024
Nb de prélèvements humains analysés	682
Nb de souches de <i>C. difficile</i>	597
Nb de souches toxinogènes	498
Recherche du fragment A3	28%*
Recherche du fragment B1	28%*
Recherche de la toxine binaire	28%*
Recherche délétion dans <i>tcdC</i>	28%*
Antibiogramme	28%*
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 de 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.

En plus des souches humaines, le CNR a reçu en 2024 96 souches issues d'abattoirs (dans le cadre de l'ANR Clost'Abat) et 187 souches d'origine environnementale (dans le cadre du projet Clost'Envir) à analyser. Les souches animales ont été analysées par PCR multiplex, PCR ribotypage et antibiogrammes. Les souches environnementales ont été analysées par PCR multiplex et PCR ribotypage.

L'analyse de l'ensemble des souches de l'ANR Clost'Abat (portant sur les souches de 2023 et 2024) est détaillée dans le **tableau II**, ainsi que la **figure 1**. Une seule souche possède la toxine binaire, il s'agit d'une souche de ribotype 126. Les principaux ribotypes retrouvés sont des ribotypes fréquemment observés lors d'infections à *C. difficile* chez l'Homme.

Tableau II : Profil toxigénique des souches du projet Clost'Abat, en comparaison avec les souches humaines analysées en 2024 au CNR.

	Souches Clost'Abat	Souches humaines (2024)
Souches toxigènes	52/58 (90%)	498/597 (83%)
Souches non toxigènes	6/58 (10%)	99/597 (17%)
Souches toxigéniques ayant la toxine binaire	1/52 (2%)	65/498 (13%)

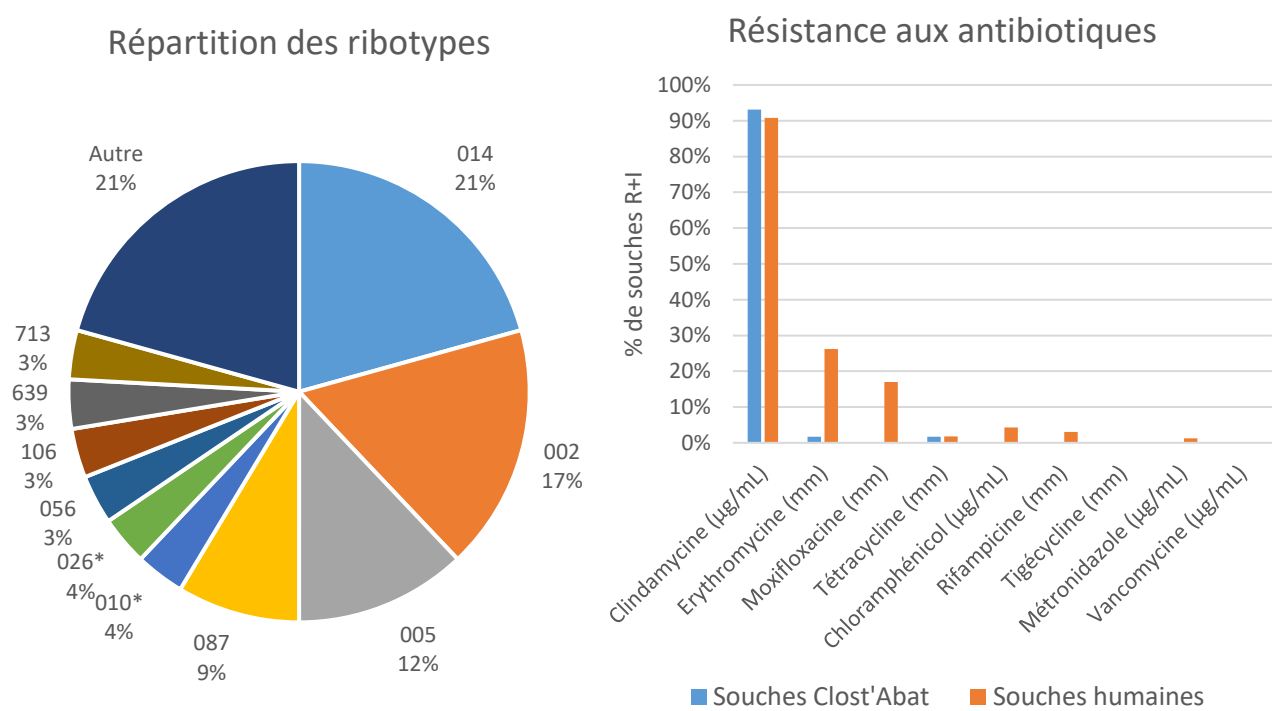


Figure 1 : Répartition des ribotypes des souches issues du projet Clost'Abat, et pourcentage de résistance (R+I) des souches du Clost'Abat comparées aux souches humaines de 2024.

L'analyse des souches environnementales est toujours en cours au moment de la rédaction de ce rapport d'activité.

Activités de séquençage

En 2024, le CNR a séquencé **240 souches** de *C.difficile*, dont 73 souches animales (30,4%) et 167 souches humaines (69,6%). Le CNR a un accès à une plate-forme de séquençage à l'Institut Pasteur, mais aussi fait appel des prestataires externes (Eurofins genomics). Les analyses à partir du séquençage aident à :

- l'investigation d'épidémie,
- la surveillance épidémiologique de certains clones,
- la caractérisation fine de certaines souches atypiques de *C. difficile* (notamment au niveau du PaLoc) ...

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

Dans les bases de données fermées :

Les données de séquençage obtenues sont stockées en interne en attente d'être publiées dans des revues à comité de lecture et analysées par des approches de cgSNP ou wgMLST (Bionumerics 8). Toutes les souches séquencées qui sont décrites dans un article soumis pour publication sont disponibles sur ENA.

☒ OUI

Illumina

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

☐ NON Si NON ou accès limité, précisez les raisons

Extérieure au CNR (INSERM1139), faculté de Pharmacie

☒ OUI

Bionumerics, enterobase et pipeline local

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

☐

NON

Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?

☒ OUI

Investigations de clusters

One health (comparaison souches humaines environnementales et animales)

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

Première ligne : PCR ribotypage

Deuxième ligne : cgMLST, wgMLST, cgSNP

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

- 20 souches humaines séquencées pour caractériser le ribotype émergent 638,
- 145 souches humaines séquencées à des fins d'études épidémiologiques.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

- 73 souches animales séquencées dans le cadre des projets Clodiff'Equi et Clost'Abat,
- 2 souches humaines séquencées pour des résistances aux antibiotiques rares

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

Partage de séquences produites par les CNR

Indiquez ici l'origine (provenance) et la nature des échantillons reçus (laboratoires contributeurs)
Précisez les modalités de partage des séquences au niveau national / international (Ex. : GISAID)

Éléments attendus : Indicateurs ou éléments factuels attestant l'ouverture/partage des données

2. Activités de surveillance

Le clone épidémique 027 représente toujours moins de 5% des souches analysées. L'émergence du clone RT638 (= ribotype 052 selon la base de données du CDRN) observée en 2023 dans plusieurs régions de France se confirme en 2024.

Description du réseau de partenaires

Le laboratoire associé « *Clostridioides difficile* » (Hôpital Saint-Antoine) assure une veille épidémiologique des infections à *C. difficile*. Il assure le typage des souches de *C. difficile* isolées des cas d'infections qui ont fait l'objet d'un signalement aux autorités sanitaires (e-sin). Les cas signalés correspondent soit à des formes sévères d'infections (cf définitions de la sévérité dans le guide « [Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance et principes de prévention et de maîtrise des infections à *Clostridioides difficile*](#) » InVS 2006) soit à des cas groupés (épidémies) .

Cependant, il est fréquent que les souches reçues n'aient pas fait l'objet d'un signalement aux autorités sanitaires. Le motif d'envoi des souches qui doit être précisé sur la feuille d'accompagnement (infection communautaire motivant l'hospitalisation, transfert en réanimation pour infection à *C. difficile*, décès lié à l'infection à *C. difficile* dans les 30 jours, hyperleucocytose >20 000/mm³, traitement chirurgical de l'infection à *C. difficile*, épidémie ou cas groupés d'infections à *C. difficile*) n'est pas toujours précisé.

Le **tableau III** montre pour tous les prélèvements reçus les motifs d'envoi (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 GeneXpert 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.

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

Motifs d'envoi (non exclusif)	2024 (197 prélèvements)		
	oui	non	NR*
Infection communautaire motivant l'hospitalisation	24	97	76
Transfert en réanimation pour infection à <i>C. difficile</i>	5	114	78
Décès lié à l'infection à <i>C. difficile</i> dans les 30 jours	5	114	78
Hyperleucocytose >20 000/mm ³	16	97	84
Traitement chirurgical de l'infection à <i>C. difficile</i>	0	116	81
Epidémie ou cas groupés d'infections à <i>C. difficile</i>	67	68	62

*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 28% des prélèvements sont envoyés par des laboratoires de ville, qui n'ont pas forcément accès au dossier complet du patient pour répondre à ces questions.

Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Le plus grand nombre de prélèvements (n=52) a été envoyé par les centres hospitaliers d'Occitanie. Cette

observation est en relation avec le nombre de centres hospitaliers dans ces régions et aussi l'intérêt particulier de certains microbiologistes vis-à-vis des bactéries anaérobies. La répartition des prélèvements envoyés selon l'origine géographique est représentée sur la **figure 2**.

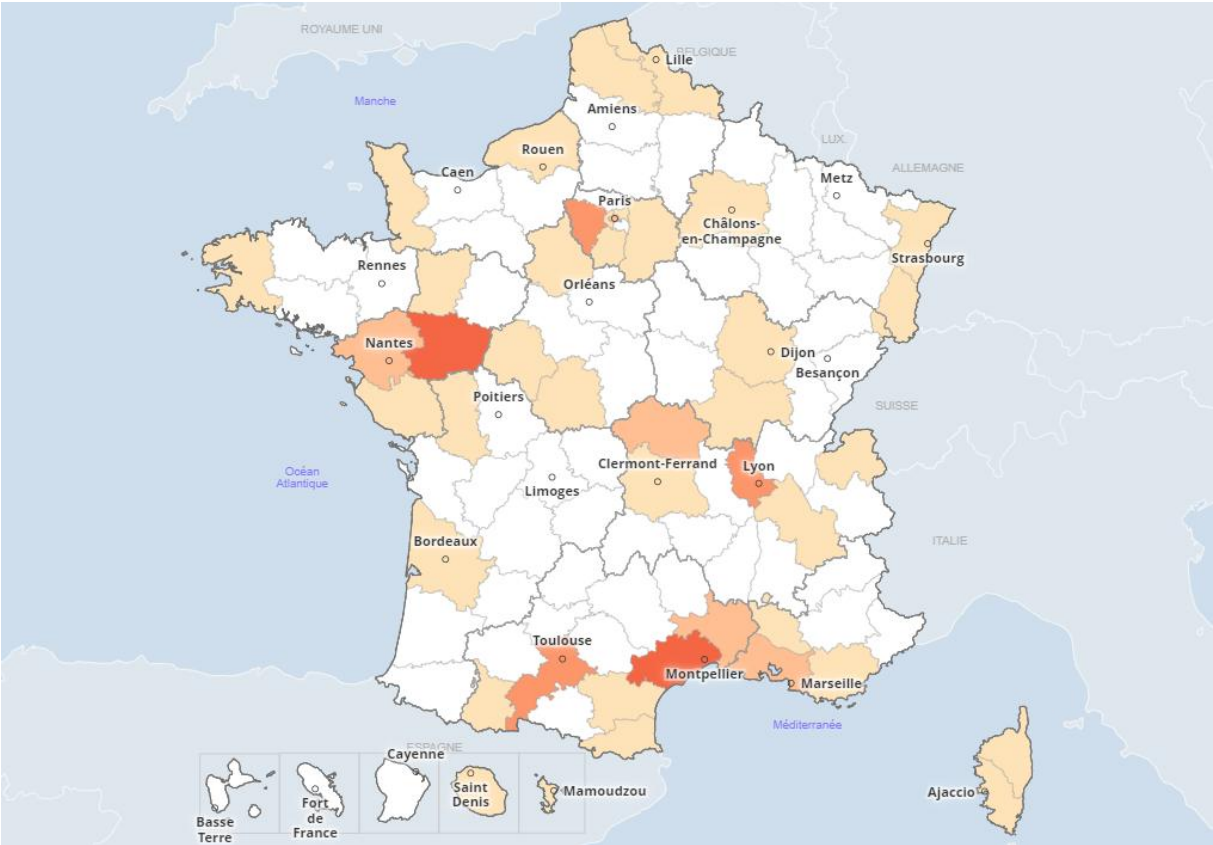


Figure 2 : Répartition des prélèvements (n=197) envoyés par département, en 2024. A noter : les départements en blanc n'ont pas envoyé de prélèvement.

En 2024, les souches de *C. difficile* toxigènes provenaient de selles (100%). Deux cent soixante (**260/498 soit 52%**) de *C. difficile* toxigènes ont été isolées chez des femmes et deux cent trente-huit (**238/498 soit 48%**) chez les hommes. On note que **62,6% (312/498) des patients ont plus de 65 ans** (versus 61,5% en 2023). La distribution en âge des patients chez qui ces souches toxigènes ont été isolées est représentée sur la **figure 3**.

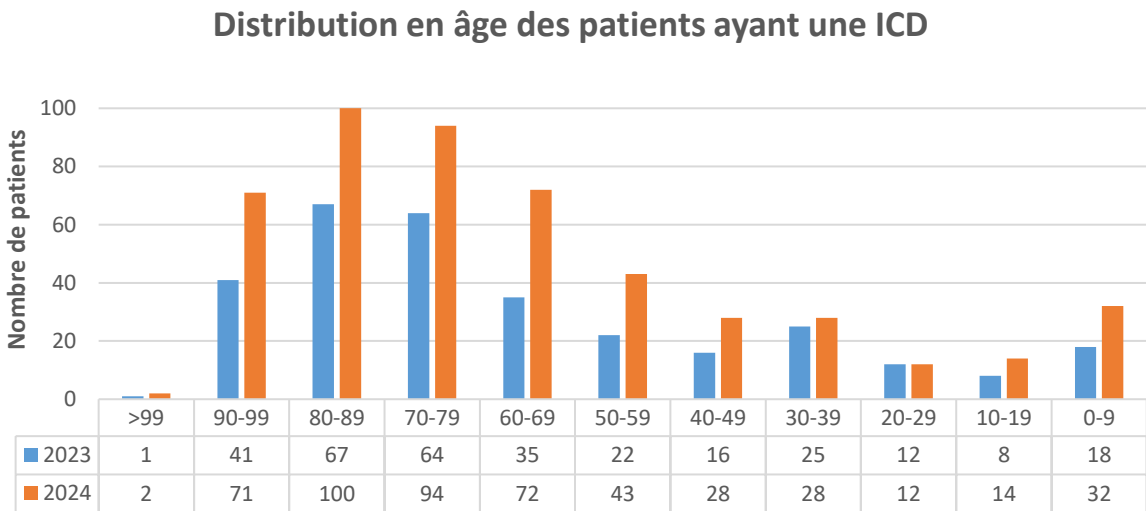


Figure 3. Répartition du nombre de patients chez qui une souche de *C. difficile* toxigène a été isolée en fonction de l'âge (2023 et 2024).

Les souches de PCR-ribotype 106, 002, 014, 010, 015, 020, 638 et 211 sont les plus fréquemment retrouvées et représentent 41% (soit 243/597) des souches (**Tableau IV et figures 4a et 4b**). On note que l’augmentation du nombre de souches RT 638, observée depuis 2022, semble se maintenir. Les autres PCR-ribotypes les plus fréquemment retrouvés sont les PCR-ribotypes 005, 078 et 039 (non toxigène).

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

PCR-ribotype	Nombre de souches (%)		
	2024	2023	2022
106	45 (7,5)	26 (7,3)	38 (8,2)
002	43 (7,2)	21 (5,9)	29 (6,3)
014	37 (6,2)	35 (9,8)	30 (6,5)
010	27 (4,5)	8 (2,2)	13 (2,8)
015	27 (4,5)	4 (1,1)	10 (2,2)
020	27 (4,5)	15 (4,2)	33 (7,1)
638	19 (3,2)	15 (4,2)	10 (2,2)
211	18 (3,0)	9 (2,5)	12 (2,6)
005	16 (2,7)	5 (1,4)	13 (2,8)
078	15 (2,5)	9 (2,5)	11 (2,4)
039	14 (2,3)	8 (2,2)	10 (2,2)
126	13 (2,2)	15 (4,2)	16 (3,5)
651	11 (1,8)	5 (1,4)	14 (3,0)
001	10 (1,7)	1 (<1)	9 (1,9)
AI-84	10 (1,7)	6 (1,7)	4 (<1)
027	5 (1,0)	5 (1,4)	18 (3,9)
Autres	250 (41,9)	149 (41,9)	174 (37,6)
Non Déterminé	0 (<1)	0 (<1)	0 (<1)
Total	597	356	463

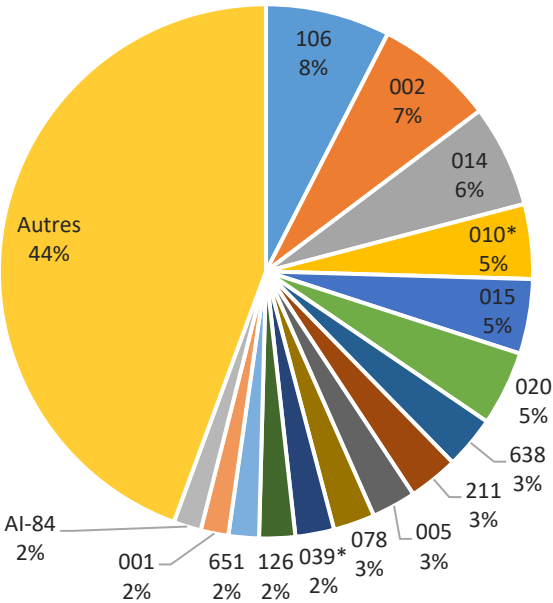


Figure 4a. Répartition des PCR-ribotypes de toutes les souches de patients analysées en 2024. Les PCR-ribotypes ne comprenant que des souches non toxigènes sont indiqués par un astérisque *.

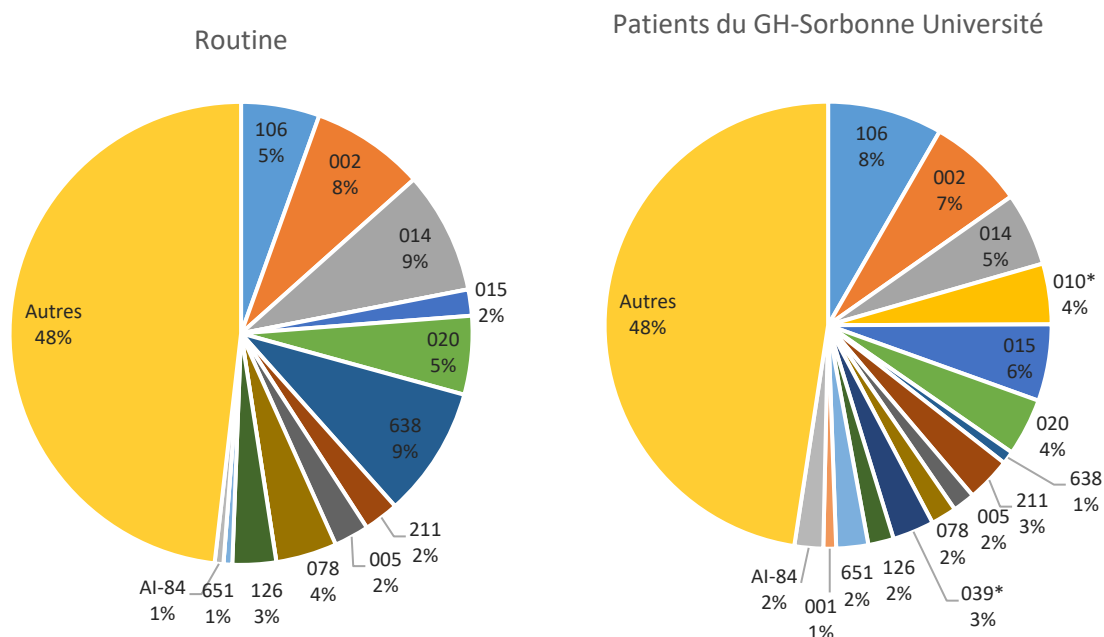


Figure 4b. Répartition des principaux PCR-ribotypes en 2024 entre les souches de routine (reçues au CNR pour analyse) et les souches étudiées de patients du GH-Sorbonne Université (SU). Les PCR-ribotypes ne comprenant que des souches non toxigènes sont indiqués par un astérisque *.

Parmi les 498 souches de *C. difficile* toxigènes, 5 (1,0%) ont été identifiées comme appartenant au **PCR ribotype 027**. Parmi ces souches 027, une souche est de PCR-ribotype 027 dit « **historique** », c'est-à-dire sensible à la moxifloxacine. Elle a été isolée à Fréjus (83) en juin 2024 (**figure 5a**).

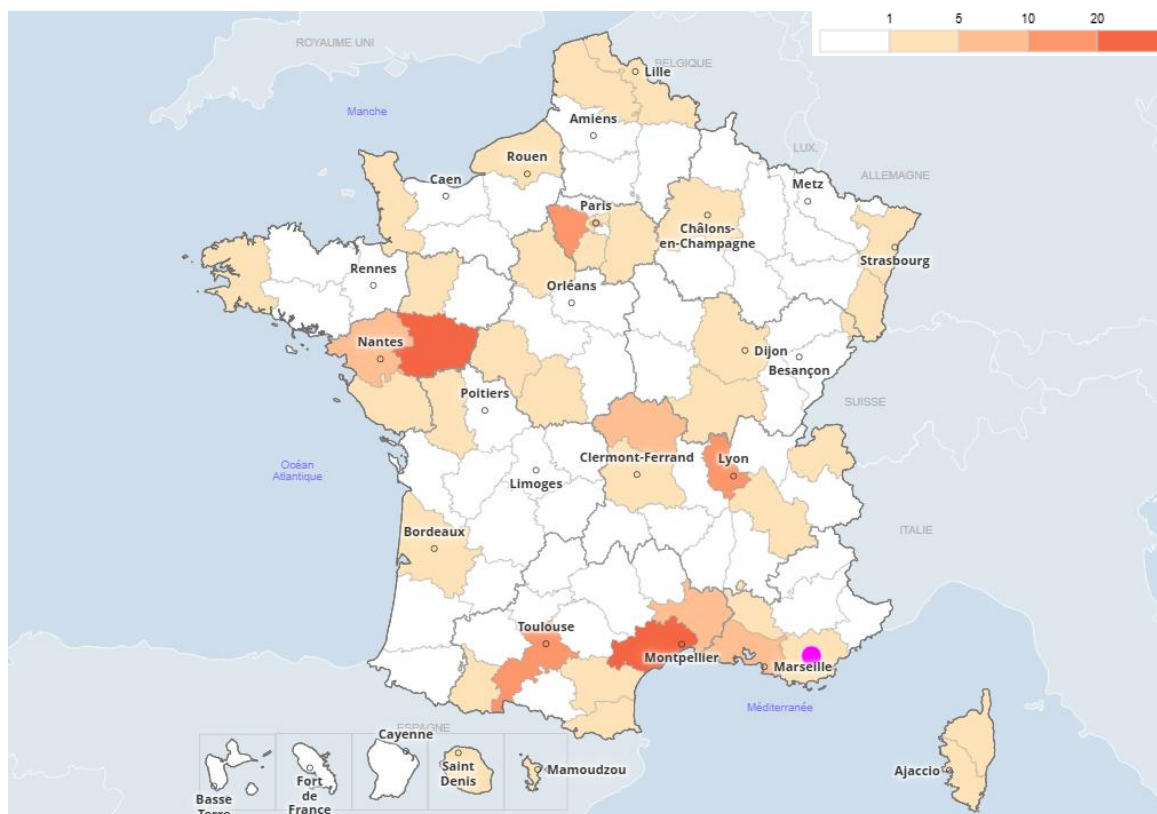


Figure 5a : Répartition de la souche PCR-ribotype 027 historique (cercle rose) en fonction des départements, en 2024. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Parmi les souches 027, 4 souches sont de PCR-ribotype 027 dit « **épidémique** » c'est-à-dire résistantes à la moxifloxacine et à l'érythromycine. Elles ont été isolées à Bron (69) et à Mulhouse (68) en mai 2024, à Paris (75) en juin et à Montpellier (34) en octobre (**figure 5b**).

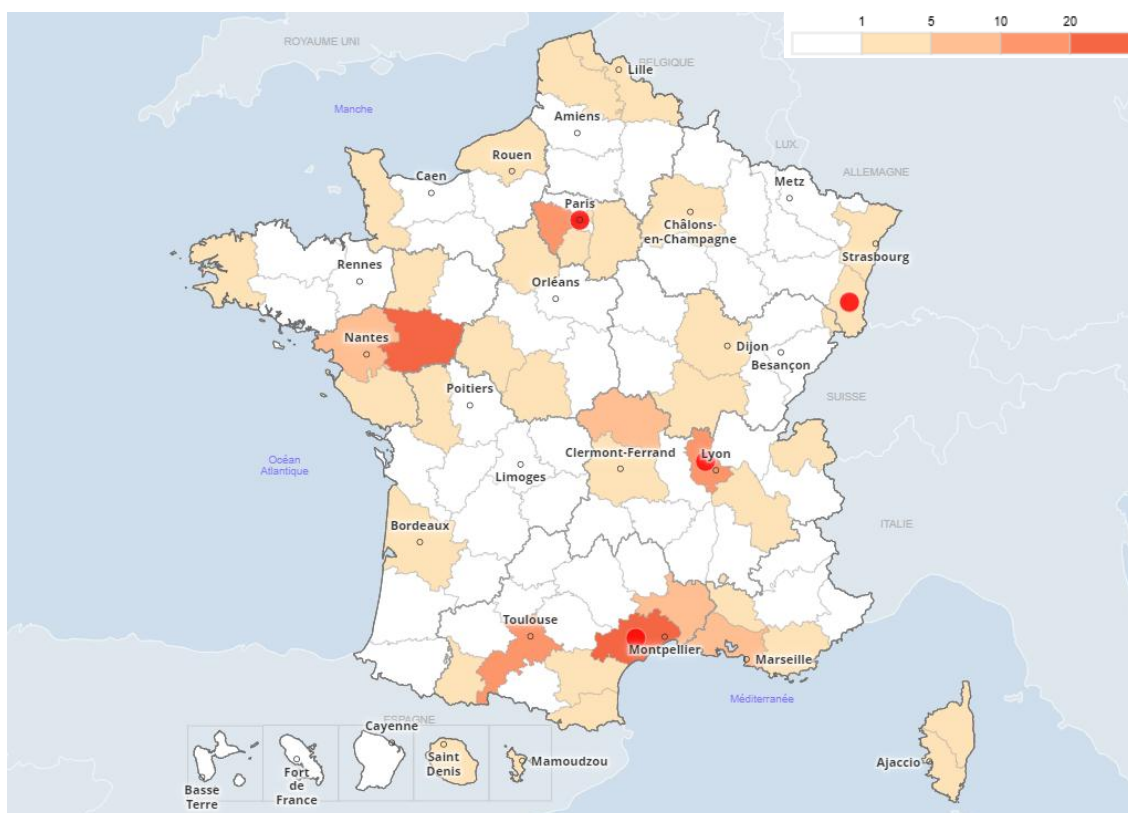


Figure 5b : Répartition des souches de PCR-ribotype 027 épidémique (cercle rouge) en fonction du département en 2024. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Le PCR-ribotype émergent 638 est le ribotype le plus fréquemment retrouvé au sein des souches de routine. Il a été principalement isolé lors d'épidémies, à Jouars-Pontchartrain (78), Chartres (28) et Orsay (91) (**Figure 6**).

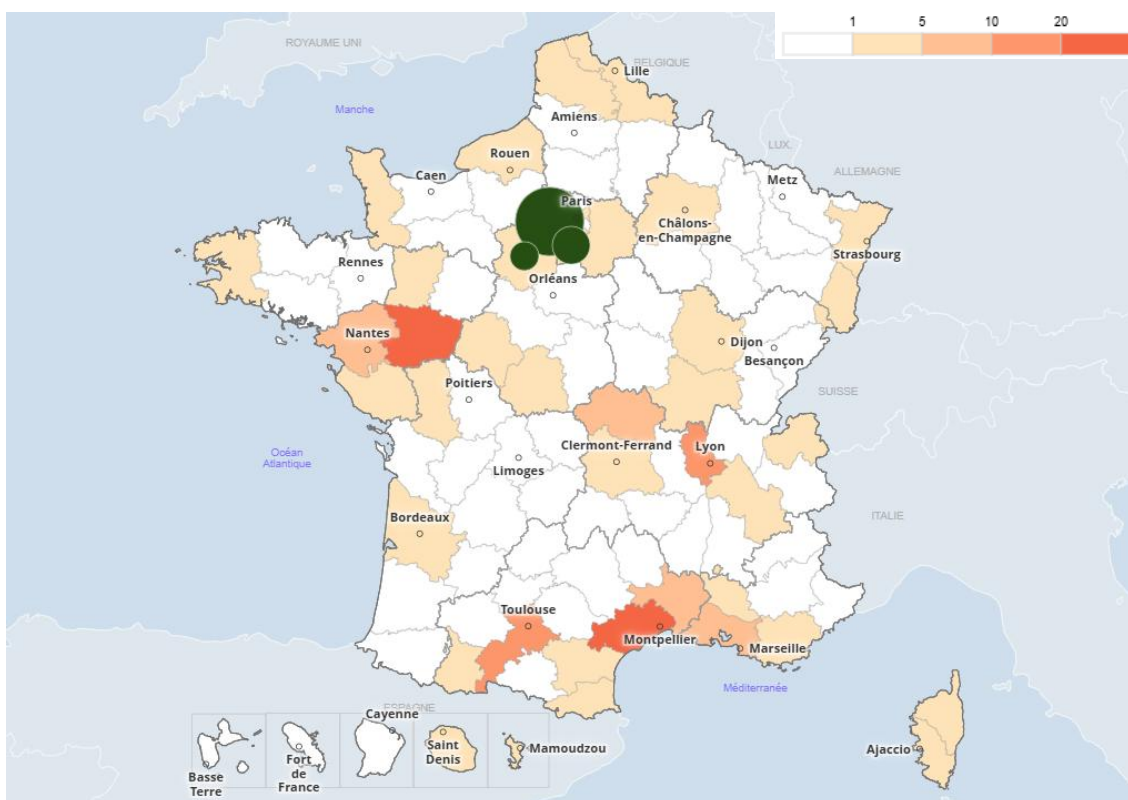


Figure 6 : Répartition des souches de PCR-ribotype 638 (cercles vert foncé) en fonction des départements en

2024. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Concernant la totalité des souches analysées, les souches de PCR-ribotype 106, 002 et 014 arrivent respectivement en 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} position (**Figures 7,8 et 9**).

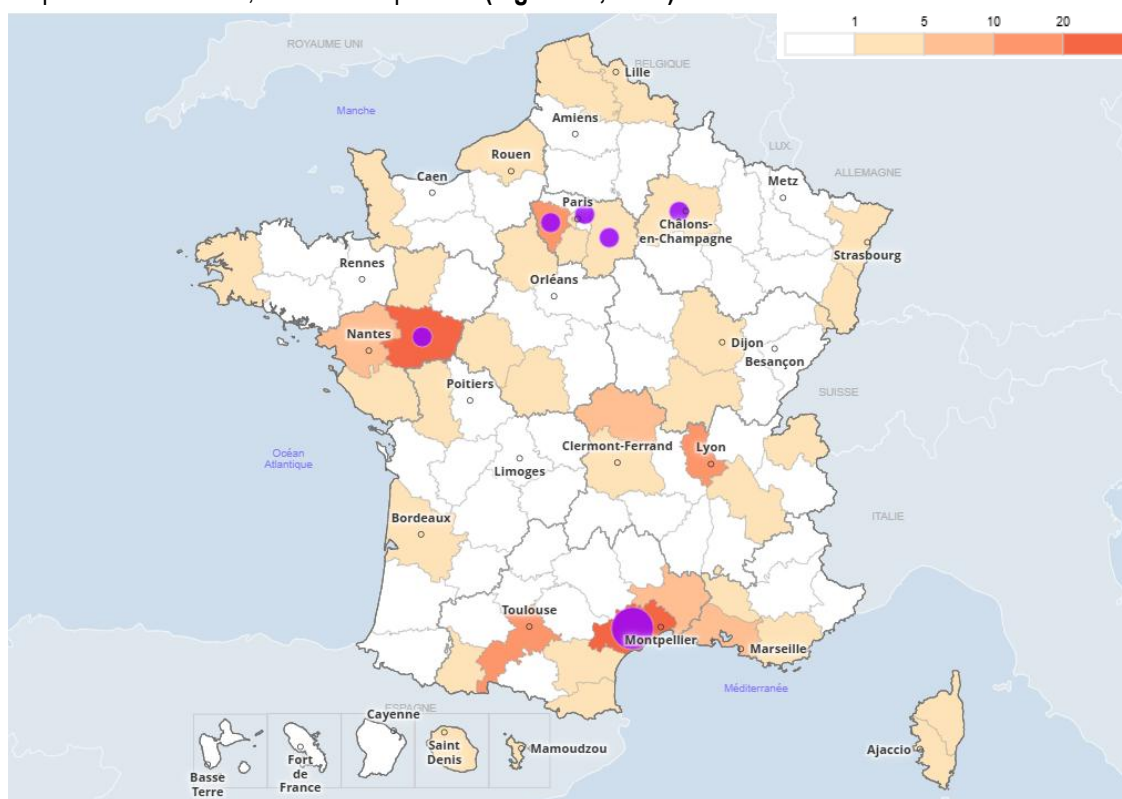


Figure 7 : Répartition des souches de PCR-ribotype 106 (cercles violets) en fonction des départements en 2024. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

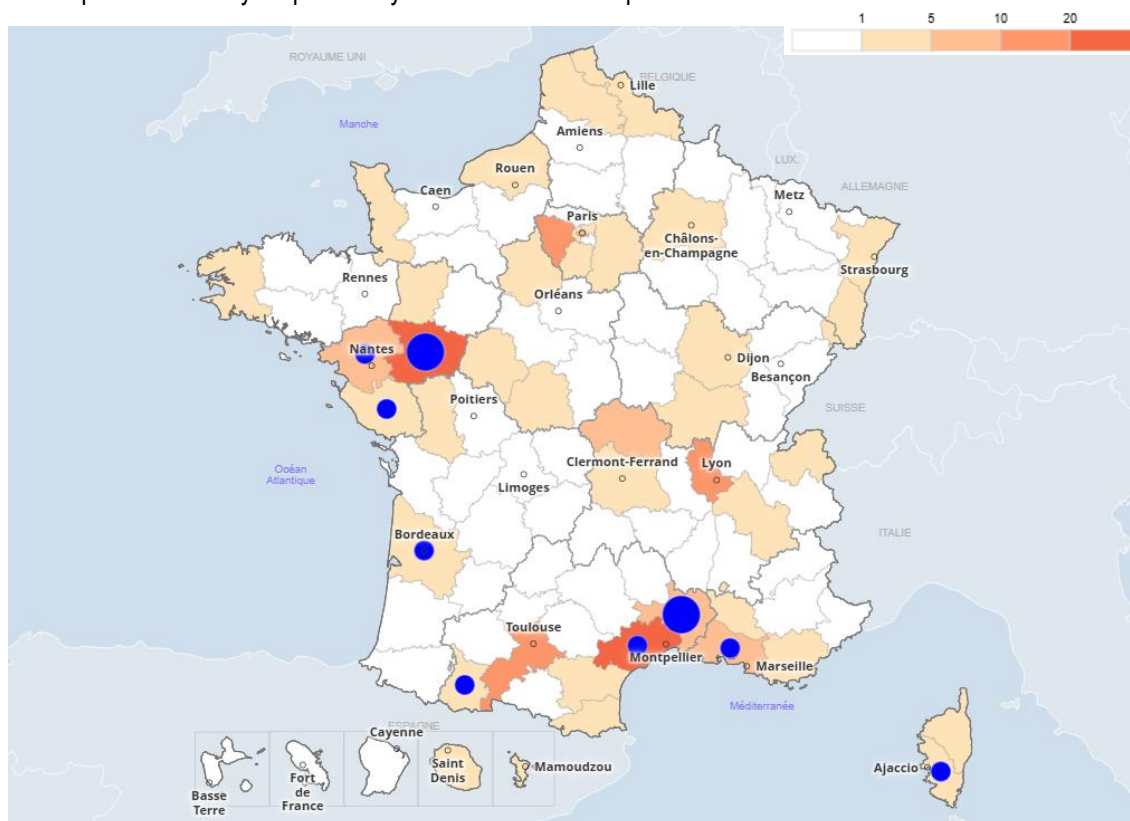


Figure 8 : Répartition des souches de PCR-ribotype 002 (cercles bleu) en fonction des départements en 2024. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

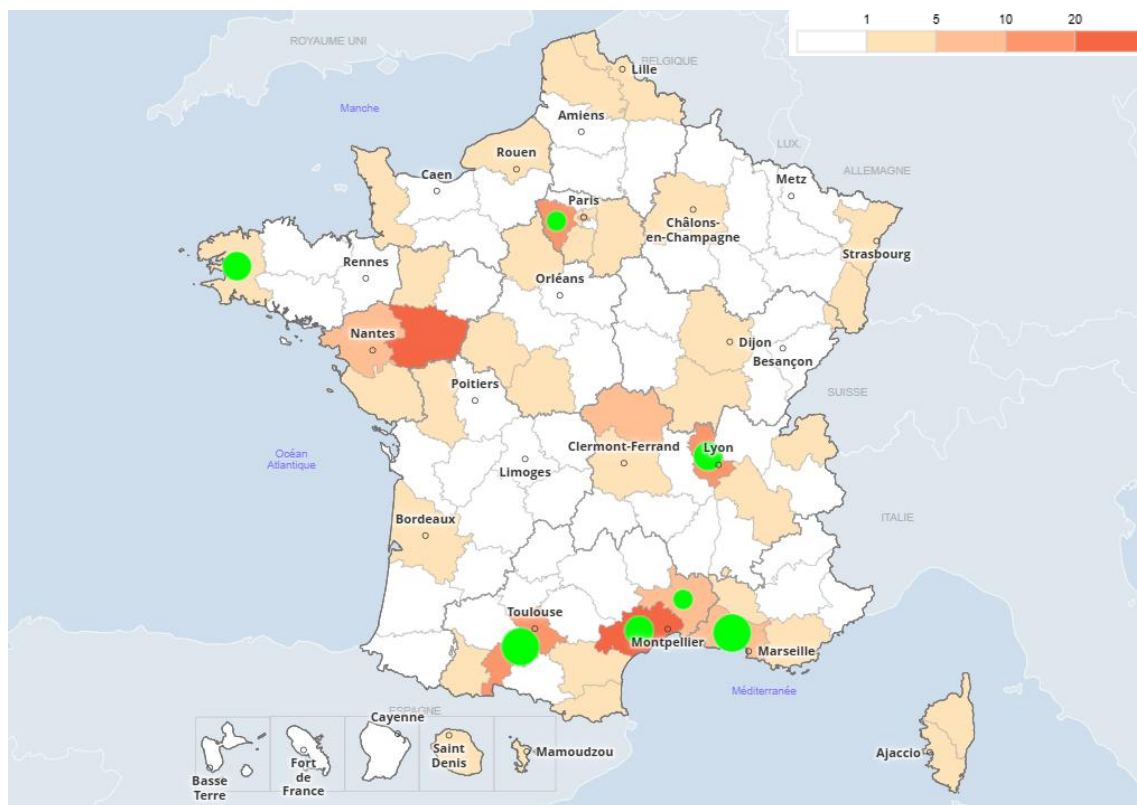


Figure 9 : Répartition des souches de PCR-ribotype 014 (cercles verts) en fonction des départements en 2024. Les départements n'ayant pas envoyé de souches sont représentés en blanc.

Parmi les souches de *Clostridioides difficile* analysées cette année (souches de routine et de veille épidémiologique), 99 souches sont non toxinogènes, et les ribotypes 010 et 039 sont dominants (**Tableau V**). De nombreuses souches non toxinogènes appartiennent à des ribotypes non répertoriés dans webRibo (« FR »).

Tableau V : Ribotypes des souches humaines non toxinogènes analysées en 2024.

Ribotype	Nombre	Ribotype	Nombre	Ribotype	Nombre
010	25	205	3	FR213	2
039	12	084	3	592	2
085	8	FR375	3	035	1
009	7	746	2	439	1
593	5	FR356	2	684	1
026	5	FR363	2	Autres FR	15

Au cours de l'année 2024, 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 VI**) par rapport à 2023.

Tableau VI : Evolution de la proportion de souches productrices de toxine binaire.

	2024	2023	2022	2021
Nb de recherches <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	207	207	399	240
Nb de recherches positives <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	16,91% (35/207)	19,81% (41/207)	17,04% (68/399)	20,00% (48/240)
Nb souches 027 <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs	5	5	18	8

<i>cdtA</i> et <i>cdtB</i> positifs chez les souches non 027 (%)	14,85% (30/202)	17,82% (36/202)	13,12% (50/381)	17,24% (40/232)
---	---------------------------	--------------------	--------------------	--------------------

Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

La sensibilité 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 (méthode des disques) a été étudiée pour 164 souches de *C. difficile* en 2024. Une détermination des CMI du métronidazole, de la vancomycine et de la clindamycine par la méthode des E-tests a été réalisée pour 164 souches.

Les taux de résistance (R+I) étaient pour l'érythromycine (diamètre < 22 mm)¹ de 26,2%, pour la clindamycine (diamètre < 15 mm)¹ de 90,8%, pour la moxifloxacine (diamètre < 18 mm)² de 17%, pour la tétracycline (diamètre < 19 mm)¹ de 1,8%, pour le chloramphénicol (diamètre < 23mm)³ de 4,3%, pour la rifampicine (diamètre < 19mm)² de 3%, et inférieur à 1% pour la tigécycline (diamètre < 21mm)² (**Tableau VII**).

Tableau VII : 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.

	Erythromycine	Clindamycine	Moxifloxacine	Tétracycline	Chloramphenicol	Rifampicine	Tigécycline
% de souches R+I	<22 mm	<15 mm	<18 mm	<19 mm	<23 mm	<19 mm	<21 mm
2022	22,5	98,1	13,6	2,8	-	-	-
2023	27,9	96,6	16,2	5,6	10,1	2,1	0
2024	26,2	90,8	17,0	1,8	4,3	3,0	0

Parmi les 164 souches de routines testées, aucune souche n'était résistante à la vancomycine (CMI > 2 mg/l)², et 2 souches étaient résistantes au métronidazole (CMI > 4 mg/l) (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : Caractéristiques des souches résistantes au métronidazole reçues en 2024.

N° de souche	PCR Ribotype	Toxines A et B	CMI Métronidazole (mg/L)
CD24-185	027 épidémique	Présence	6
CD24-206	010	Absence	32

La répartition des CMI de la vancomycine et du métronidazole pour les 155 souches **toxigènes** est présentée sur la **figure 10**.

¹ Selon CASFM 2013

² Selon CASFM-EUCAST Juin 2023

³ Selon CASFM 2020

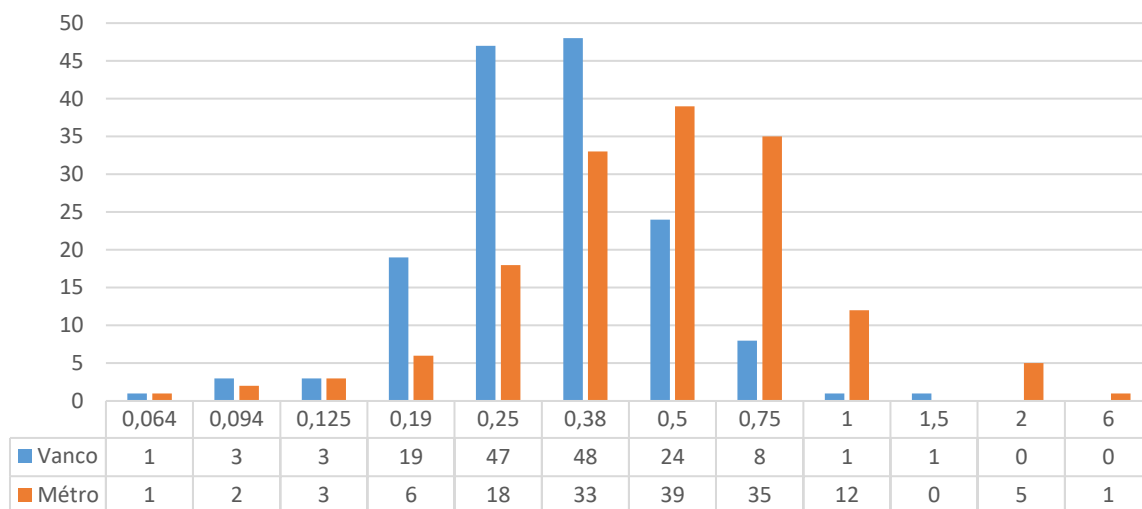
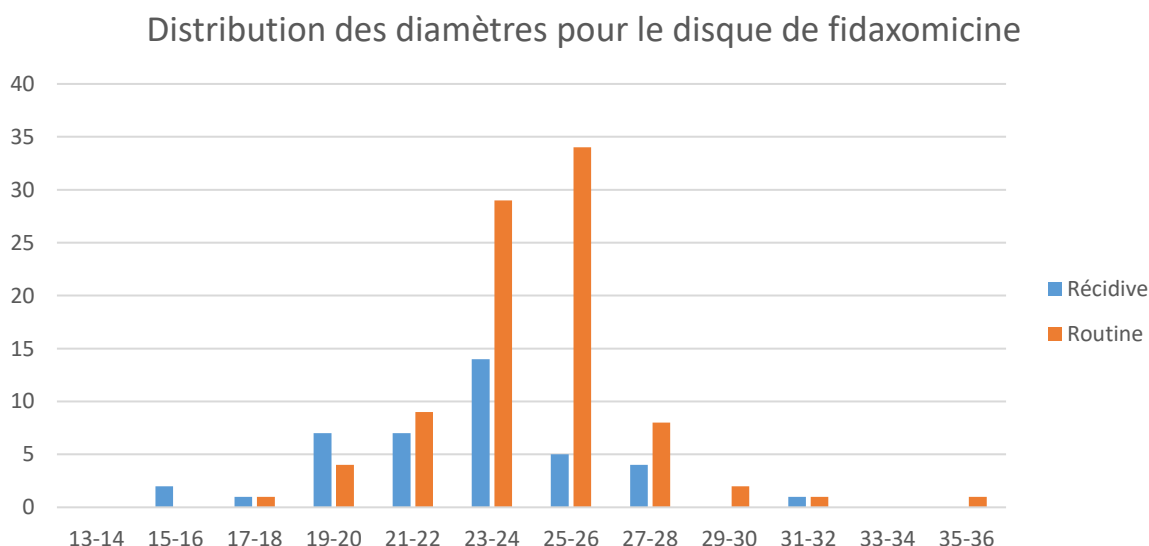


Figure 10 : Répartition des CMI Vancomycine et Métronidazole pour les 155 souches toxigènes.

- **Suivi 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 2024, 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 11** montre la répartition des diamètres. Les souches isolées de récurrences chez les patients ayant été préalablement traités par la fidaxomicine ont des diamètres inférieurs aux souches isolées de la routine ($p<0,001$).



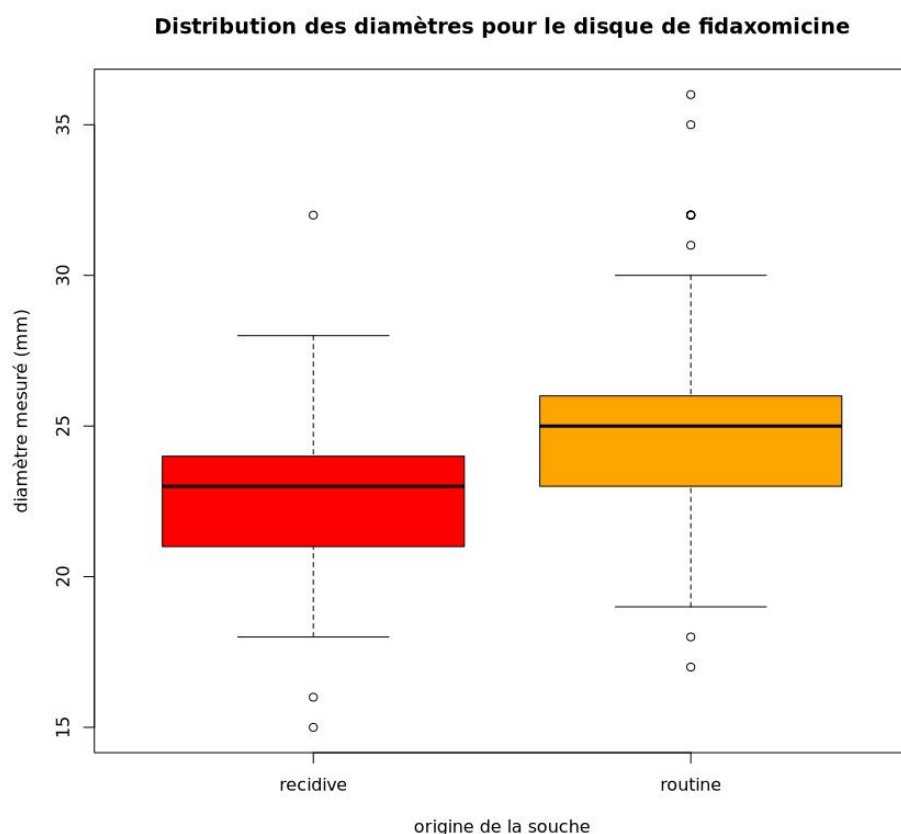


Figure 11 : Distribution des diamètres d'inhibition des souches vis-à-vis de la fidaxomicine.

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

Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

- F. Barbut est membre de l'ESGCD (European Study Group on *C. difficile*).
- F. Barbut est membre du comité d'organisation de l'International *Clostridioides difficile* symposium (ICDS)
- F. Barbut a participé en 2022 à l'analyse des résultats du projet européen « 'ECDC CDI WGS study, 2021' (Séquençage des souches de *C. difficile* de ST1).
- F. Barbut participe activement aux études réalisées sous l'égide de l'ECDC sur la surveillance des infections à *C. difficile*. Il est notamment intervenu à un Workshop organisé par l'ECDC sur le diagnostic des infections à *C. difficile* en 2017 et 2019 et a participé à la révision du protocole 'ECDC CDI WGS study, 2022'.
- J. Couturier et F. Barbut sont membres 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...).

Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Pour chacune de ces études, décrivez **en une page maximum** : (i) les objectifs de l'enquête, (ii) les partenaires, (iii) la contribution du CNR, (iv) l'état d'avancement et (v) principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication.

Exemples : étude de la couverture immunitaire et de son évolution ; enquête cas-témoins pour identifier des facteurs de risque ; étude d'incidence ; étude sur les facteurs associés à l'isolement d'un sous type particulier d'agent pathogène, d'un type de résistance,...

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

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 à en ville.

Au total, 154964 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 intra-hospitalières 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., FOUAD F., VANHEMS P., GAVAZZI G., BARBUT F., 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 (CLODIA SNDS study)

In preparation

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

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

RICAI 2022, Paris

Alertes

Décrivez ici les cas groupés et/ou phénomènes anormaux ayant fait l'objet d'une détection et/ou investigation par le CNR au cours de l'année N : brève description des événements en décrivant les apports du CNR (détection, comparaison de souches, expertise, ...) et les modalités d'alerte à Santé publique France et/ou la DGS.

Renseignez le nombre d'interventions pour l'aide à la décision (Ex. : cellule d'aide à la décision...)

Renseignez le nombre de sollicitations émanant de la DGS / ARS dans le cadre d'investigations.

Rappel : la procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal peut être décrite en annexe 1 (organisation du CNR).

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 (cf guide Raisin, 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 2024 a été marquée par l'émergence du clone épidémique 638

Emergence nationale d'un clone épidémique de *Clostridioides difficile* : caractérisation clinique et microbiologique

Le CNR *Clostridioides difficile* (CD) observe depuis plusieurs années l'émergence d'un nouveau clone de CD, identifié comme le PCR ribotype (RT) 638. Ce clone a été à l'origine depuis 2019 de cas groupés d'infections à CD dans plusieurs établissements de santé. L'objectif de cette étude était de caractériser les patients infectés et d'étudier la clonalité des souches.

Matériels et méthodes. Une enquête épidémiologique a été réalisée auprès des 32 patients infectés hospitalisés dans 14 établissements de santé (ES) entre 2019 et 2024. Un questionnaire standardisé a été envoyé aux ES afin de recueillir des informations cliniques sur les patients infectés. Les génomes des souches ont été séquencés par la technique Illumina® et les données de séquences ont été analysées par cgMLST et cgSNP.

Résultats. Un questionnaire a été complété pour 17 des 32 patients infectés. L'âge médian des patients était de 87 ans, avec un ratio homme/femme de 0,7. Parmi ces patients, 12 sur 17 avaient des antécédents d'hospitalisation dans les trois mois précédents, et un seul était immunodéprimé. Tous les patients présentaient au moins un facteur de risque : 17 étaient âgés de plus de 65 ans, 16 avaient été traités par antibiotique dans les 3 mois précédents et 2 avaient des antécédents d'infection à CD. Les formes compliquées et compliquées-sévères représentent 47% des infections. Tous les patients sauf un ont été traités (7 par vancomycine per os, 5 par fidaxomicine, 3 par métronidazole intraveineux et 2 par métronidazole intraveineux + vancomycine per os). Concernant l'évolution clinique, 14 patients ont guéri, 2 sont décédés, et l'évolution clinique d'un patient reste inconnue. Toutes les souches étudiées produisaient les toxines A et B mais pas la toxine binaire. Elles étaient toutes sensibles à la vancomycine au métronidazole mais majoritairement résistantes à l'érythromycine (30/32) et à la moxifloxacine (29/30). L'analyse phylogénétique a

confirmé la transmission de la même souche dans les établissements ayant rapporté des épidémies et a indiqué une dissémination très clonale de ce RT en France.

Conclusion. Les souches de RT638, inconnues avant 2022, représentent maintenant en France 4% des ribotypes circulants. La diffusion de ce clone est nationale et souvent associé à des épidémies.

*BERTHET C, MESA V, EHMIG M, COUTURIER J, STORDEUR F, BARBUT F ET groupe d'étude du RT638
Emergence nationale d'un clone épidémique de Clostridioides difficile : caractérisation clinique et microbiologique)
43^{ème} RICA, 16-17 décembre 2024. Communication orale*

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

Ce chapitre concerne principalement les activités à destination des professionnels de santé (notamment formation aux techniques de laboratoire) ; **les activités liées à l'enseignement et la formation universitaires sont exclues.**

Conseil et expertise aux professionnels de santé

- Enseignements sur **C. difficile 2024**

Cadre de l'enseignement	Disciplines concernées	Diplôme	Type d'enseignement
Université Paris VII Paris Diderot Hôpital Bichat	Réanimation	DURPI (DU de réanimation de pathologies infectieuses)	Cours
Université de Paris	Infectiologie	DIU Infections Nosocomiales Hygiène Hospitalière	Cours
Sorbonne Université	Réanimation	DU en soins infirmiers de réanimation et urgences vitales	Cours
Université de Paris Université de Versailles - Saint-Quentin en Yvelines – Université de Bordeaux	Infectiologie	DIU Stratégies thérapeutiques et préventives en pathologie infectieuse	Cours
Sorbonne Université	Microbiologie	DU Microbiote et santé (Pr K. Clément)	Cours
Université de Grenoble	Microbiologie	DU Thérapeutiques et Microbiotes (Pr Murielle Cornet)	Cours
Université de Nantes	Microbiologie/ infectiologie	DU "les Agents Infectieux à l'Ere de la Génomique" (Prs Florent Morio & Stéphane Corvec)	Cours

F. Barbut participe à des enseignements de formation continue en Microbiologie :

- **Université Mérieux, Lyon** : « Formation sur les bactéries anaérobies (3 jours)

F. Barbut a été membre du Comité d'organisation du 8th International *C. difficile* symposium (Bled Slovénie, septembre 2024)

- **Stagiaires accueillis 2023-2024**

Organisme Nom de l'Etudiant	Diplôme / Sujet	Année
Thèse d'Université en co-tutelle	Doctorat de sciences	2021-2024

Anais Lemaire	<i>Clostridioides difficile</i> chez les Equidés : rôle du portage asymptomatique et des biofilms dans la persistance des infections et le potentiel zoonotique	
These d'Université Adriana Badillo	Caractérisation d'une famille de petites protéines régulée par des riboswitches répondant à des seconds messagers chez <i>Clostridioides difficile</i>	2021-2024
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
Master 2 Vinciane Baillieu	Étude de l'impact de procédés de traitements de transplants de microbiote fécal sur l'activité in vitro anti- <i>Clostridioides difficile</i>	2023-2024

- **Liste des guides élaborés**

KUIJPER E., REUSBAET F., BARBUT F.

Clostridium, Clostridioides and other clostridia

In « Manual of Clinical Microbiology », 13th edition, ASM press , 2022

BARBUT F., ECKERT C., LE MONNIER A.

Clostridioides difficile

REMIC, 2022, chapitre 58

Fiche EFFICATT. « *Clostridium difficile* » INRS 2024

- **Modalités et cibles de diffusion**

Le laboratoire « *C. difficile* » associé au CNR des Bactéries anaérobies a mis à disposition des numéros de téléphone (01 49 28 09 89 / 01 71 97 09 86 / 01 71 97 09 85) et des adresses email (frederic.barbut@aphp.fr, jeanne.couturier@aphp.fr) afin de répondre aux demandes de conseils (thérapeutiques, diagnostiques, hygiène). Bien que le nombre d'appels ne soit pas formellement enregistré, on peut estimer leur fréquence à un minimum de 1 appel par jour ouvrable.

Les demandes de renseignements ou de conseils se font directement par téléphone ou e-mail auprès des responsables du CNR.

- **BARBUT F.**

Diagnostics of *C. difficile* infections - unanswered questions

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

Bled, Slovénie, 17-20 septembre 2024

- **BARBUT F.,**

Evaluation of GI Bacterial PLUS ELite MGB® Kit for the diagnosis of *Clostridioides difficile* infection (CDI)

Symposium Elitech

34th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 27-3 avril 2024, Barcelone.

- **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.

- Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/bacteries-anaerobies-et-botulisme/activites>
Le site web du CNR des bactéries anaérobies et du botulisme et de son laboratoire associé hébergé à l'Institut Pasteur a été actualisé en 2017.
- Site web spécifique à la surveillance de *C. difficile* : site réservé aux laboratoires du réseau, à santé publique France et aux Cpias. Ce site permet au laboratoire associé d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu des résultats qui est envoyé aux biologistes qui ont envoyé des souches.
- 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>
- Participation à la rédaction du guide raisin « Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *C. difficile* » (http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2006/guide_raisin/conduite_clostridium_difficile.pdf)

Conseil et expertise aux autorités sanitaires

F. Barbut et Imane Mostaghat/Jeanne Couturier sont en contact 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.

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

Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.

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

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

Evaluation de 12 tests immuno-enzymatiques pour la détection de la glutamate déshydrogénase (GDH) et des toxines of *Clostridioides difficile*

Background: *Clostridioides difficile* is the major cause of healthcare-associated diarrhea. Guidelines for the diagnosis of *C. difficile* infections (CDI) have been updated in 2016 by the ESCMID and recommend the use of a two-step algorithm and the detection of free toxins in stools. The objectives of this study were to assess the performances (sensitivity and specificity) of (i) 6 immuno-enzymatic assays (Techlab Quik Chek [Sobioda], Immunocard [Launch Diagnostics], JusCheck [Elitech Microbio], Certest [Theradiag], Monlab [Keyoflab], GDH sign [Servibio]) for the detection of GDH alone, and ii) 6 immuno-enzymatic assays for the combined detection of GDH and toxins (same companies).

Material/Methods: 99 stool samples stored at -80°C were used for this evaluation: 84 were positive in culture on selective media (ChromId, Biomérieux) including 47 stools positive for free toxins (stool cytotoxicity assay on MRC-5 cell culture), and 15 were negative for both culture and cytotoxicity assay. The twelve tests were performed simultaneously according to manufacturer's instructions. Interpretation of the tests was done by two independent technicians.

Results: The sensitivity and specificity of each test are described in the table below

	GDH assay			Combined assay for GDH and Toxin				
	GDH			GDH		Toxins A or B		
	Sensitivity	Specificity	Invalid	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Invalid
Quik Chek	99%	100%	2%	95%	100%	81%	100%	0%
Immunocard	96%	93%	2%	90%	100%	50%	100%	0%
Jus Check	79%	100%	0%	82%	100%	19%	100%	0%
Certest	95%	100%	0%	95%	100%	67%	100%	0%
Monlab	96%	100%	0%	96%	100%	71%	96%	0%
Servibio	93%	100%	0%	95%	100%	73%	98%	0%

Conclusion: The different assays under evaluation displayed a high sensitivity and specificity for detecting GDH. However, detection of toxins is highly variable across the different assays. In our hands, Quik Chek had the best performances whereas JusCheck lacks sensitivity for toxin detection.

FILLION M., EHMIG M., CASSIR N., ECKERT C., DELAGE J., MOSTAGHAT I., BARBUT F.

Simultaneous evaluation of 12 immuno-enzymatic assays for the detection of glutamate dehydrogenase (GDH) and toxins of *Clostridioides difficile*.

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

Bled, Slovénie, 17-20 septembre 2024

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

Background: *Clostridioides difficile* is the major cause of healthcare-associated diarrhea. Guidelines for the diagnosis of *C. difficile* infections (CDI) have been updated in 2016 by the ESCMID and recommend the use of a two-step algorithm starting with a sensitive screening method such as GDH detection of nucleic acid amplification technique (NAAT). The objective of this study was to compare the performances (sensitivity and specificity) of the standard M10 *C. difficile* (SD Biosensor) and the Xpert *C. difficile* (Cepheid) assays for the detection of toxigenic *C. difficile* strains.

Material/Methods: 224 consecutive fresh diarrheal stool samples were included for this evaluation. Following routine testing by the *C. diff.* complete assay (TechLab), M10 and GenXpert were tested in parallel alongside with toxigenic culture (reference standard) on selective medium (ChromID, Biomérieux). The M10 and GenXpert assays were performed according to manufacturer's instructions by two independent technicians. We also compared the results of the M10 assay from native stool samples and stools taken in a rectal-swab.

Results: 23 stool specimens (10.2 %) were positive in toxigenic culture including 16 stools positive for free toxins. Both M10 and Xpert demonstrated high sensitivity and specificity as shown in the table below. The *cdtB* cycle threshold (Ct) values obtained with the M10 and Xpert assays were highly correlated with a Pearson correlation coefficient of 0.810 ($p < 0.001$). The median *tcdB* Ct values for toxin EIA-positive/NAAT positive specimens were significantly lower to those for toxin EIA-negative/NAAT positive specimens in both M10 (25.5 vs 33.1) and Xpert assays (23.8 vs 30.4) ($p < 0.005$). Receiver operating characteristic curve analysis, assessing the predictive ability of Ct values for the detection of free toxins exhibited an area under the curve of 0.837 for M10 and 0.830 for Xpert. The agreement between M10-positive native stools ($n=9$) and rectal swabs was good; however, the Ct values from rectal swab (200 μ l) were higher (median +0.5 Ct) than from native stools.

	Sensitivity (CI95%)	Specificity (CI95%)	NPV (CI95%)	PPV (CI95%)	Accuracy (CI95%)
M10 assay	100 (85.15-100)	98.51 (95.72-99.69)	100 (98.16-100)	88.46 (71.38-95.93)	98.67 (96.15-99.72)
Xpert assay	95.65 (78.05-99.89)	98.02 (95.01-99.46)	99.5 (96.68-99.95)	84.62 (67.49-93.58)	97.78 (94.89-99.27)

Conclusion: The Standard M10 *C. difficile* assay displayed a high sensitivity and specificity for detecting toxigenic strain. M10 and Xpert CT values can be used as predictors for the detection of free toxins in stools.

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

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

Background: Multiple 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)

Bled, Slovenia, 17-20 septembre 2024

Poster 02063

Gut microbiota composition and *Clostridioides difficile* infection: the potential protective role of *Faecalibacterium prausnitzii*

The gut microbiota plays a pivotal role in *Clostridioides difficile* infection (CDI). We aimed to compare the composition of the gut microbiota of patients with CDI, patients asymptomatically colonized by *Clostridioides difficile* (CDC), patients with non-*C. difficile* diarrhea (NCD) and healthy controls (HC) through 16S rRNA gene amplicon sequencing.

A total of 12 patients with CDI were included. Each case patient was matched with 4 asymptomatic CD carriers (CDC) including 2 with toxigenic CD strains, 2 patients with non-*C. difficile* diarrhea (NCD) and 2 healthy controls (HC). Patients in each group were matched by age subgroups (<3 years old, 3-18 years old, 18-65 years old, and > 65 years old), and antibiotic exposure. PCR amplification of V3 to V4 hypervariable regions of 16S rRNA gene was performed. Purified amplicons were sequenced at paired ends with an Illumina MiSeq instrument. 16S sequencing data were analyzed using the Phyloseq, Microbiome, MicrobiomeMarker, and MicrobiotaProcess R packages (V4.3.1). Taxa associated with each group were also determined by the linear discriminant analysis (LDA) effect size (LefSe) algorithm.

We found a significantly higher bacterial richness in the HC group compared to the CDC, NCD and CDI groups. Beta-diversity analysis of the gut microbiota in our cohort showed that the Unifrac index differed significantly between all groups. The gut microbiota of asymptomatic patients colonized with CD was significantly enriched with *Hungatella* sp., *Enterocloster aldenensis*, and *Clostridium scindens*. Healthy controls' gut microbiota was significantly enriched with *Faecalibacterium prausnitzii*, *Sporobacter* sp., *Mediterranibacterium torques*, *Campylobacter hominis*, *Blautia* sp., *Mobiluncus cortisii*, *Anerotignum* sp., and members of the *Lachnospiraceae* family. When compared to the HC group, the most significantly depleted taxa in the gut microbiota of patients with CDI was *Faecalibacterium prausnitzii*.

CASSIR N., COUTURIER J., DELANOYE J., WOLFROMM A., KASSIS-CHIKHANI N., BARBUT J.

Gut microbiota composition and *Clostridioides difficile* infection: the potential protective role of *Faecalibacterium prausnitzii*

Gut Pathogens Reports 2024, accepté

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

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.

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.

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.

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, 2024, soumis

Contamination des viandes fraîches de volailles par *C. difficile* (projet avec la DGAL et l'ANSES)

En 2022, la prévalence de *C. difficile* sur les produits de volailles avec peau (cuisses) et sans peau (escalopes) est de 0.9% (n) 465 unités).

DENIS M, BONIFAIT L., BARBUT F, HOURS 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.

Detection and characterization of *Clostridioides difficile* in broiler slaughterhouses

The raise of community-acquired *Clostridioides difficile* infection over the past decade in humans has resulted in the study of the potential reservoirs of *C. difficile* strains and risks associated with identified sources. Attention has been paid to the contamination of food as this can be an important route of transmission. Studies currently available in the literature have revealed that a wide range of foods are contaminated by *C. difficile*, including poultry meat. No data is available regarding the contamination of the poultry meat in France, however a previous study has shown that *C. difficile* is frequently detected at farm level in broilers. The objective of this study, part of the ClostAbat project funded by the French National Research Agency (CE21-21-007), was to evaluate the contamination by *C. difficile* at the broiler slaughterhouse level all along the process from animal reception to cutting and to characterize the isolated strains.

We performed 12 sampling campaigns in three broiler slaughterhouses with 2 flocks per campaign and collected 29 samples per flock (broiler caeca, meat, surface and ambient air samples) along the slaughter line and in the meat-cutting plan. *C. difficile* was detected using a culture method (enrichment in supplemented BHI during 7 days at 37°C under anaerobic conditions followed by plating on ChromID) and further characterized (PCR-ribotype, main virulence genes using PCR and antibiotic susceptibility).

C. difficile was detected in 42 samples out of the 695 that were collected: 8/24 in transport crates, 14/24 in scalding tank, 11/24 in plucking machine, 1/24 on apron and gloves, and 3/24 in viscera conveyor at the evisceration stage, 1/24 in carcass conveyor at the chilling stage, 1/24 on the floor in the cutting area and in 3 pool of cecal contents/120. Up to 5 isolates were collected per positive sample and further characterized. Among the 198 collected strains, 21 different PCR-Ribotypes were detected, RT002/2 and 014/0 being the most prevalent ones. Genes encoding Toxin A and B were detected in 182 isolates but none of the isolates harboured binary toxin genes. All strains were susceptible to vancomycin, metronidazole, rifampicin and moxifloxacin; 97% were resistant to clindamycin, 2.5% to erythromycin, 3.5% to tetracycline and 0.5% to tigecycline.

While *C. difficile* was detected at the slaughterhouse during the process, neither neckskins nor drumsticks were positive suggesting a low or absence of contamination of the final products in the poultry sector.

LE MARÉCHAL C, POEZEVARA T., JAMBOU L., THOMAS R., ROUXEL S., EHMIG M., HUNEAU-SALAÜN A., LE BOUQUIN S., COUTURIER J., FILLION M., FIRMESSE O., BARBUT F.

Detection and characterization of *Clostridioides difficile* in broiler slaughterhouses
8th International symposium on *Clostridioides difficile* (ICDS)

Bled, Slovénie, 17-20 septembre 2024

Poster

Emergence nationale d'un clone épidémique de *Clostridioides difficile* : caractérisation clinique et microbiologique

Le CNR *Clostridioides difficile* (CD) observe depuis plusieurs années l'émergence d'un nouveau clone de CD, identifié comme le PCR ribotype (RT) 638. Ce clone a été à l'origine depuis 2019 de cas groupés d'infections à CD dans plusieurs établissements de santé. L'objectif de cette étude était de caractériser les patients infectés et

d'étudier la clonalité des souches.

Matériels et méthodes. Une enquête épidémiologique a été réalisée auprès des 32 patients infectés hospitalisés dans 14 établissements de santé (ES) entre 2019 et 2024. Un questionnaire standardisé a été envoyé aux ES afin de recueillir des informations cliniques sur les patients infectés. Les génomes des souches ont été séquencés par la technique Illumina® et les données de séquences ont été analysées par cgMLST et cgSNP.

Résultats. Un questionnaire a été complété pour 17 des 32 patients infectés. L'âge médian des patients était de 87 ans, avec un ratio homme/femme de 0,7. Parmi ces patients, 12 sur 17 avaient des antécédents d'hospitalisation dans les trois mois précédents, et un seul était immunodéprimé. Tous les patients présentaient au moins un facteur de risque : 17 étaient âgés de plus de 65 ans, 16 avaient été traités par antibiotique dans les 3 mois précédents et 2 avaient des antécédents d'infection à CD. Les formes compliquées et compliquées-sévères représentent 47% des infections. Tous les patients sauf un ont été traités (7 par vancomycine per os, 5 par fidaxomicine, 3 par métronidazole intraveineux et 2 par métronidazole intraveineux + vancomycine per os). Concernant l'évolution clinique, 14 patients ont guéri, 2 sont décédés, et l'évolution clinique d'un patient reste inconnue. Toutes les souches étudiées produisaient les toxines A et B mais pas la toxine binaire. Elles étaient toutes sensibles à la vancomycine au métronidazole mais majoritairement résistantes à l'érythromycine (30/32) et à la moxifloxacine (29/30). L'analyse phylogénétique a confirmé la transmission de la même souche dans les établissements ayant rapporté des épidémies et a indiqué une dissémination très clonale de ce RT en France.

Conclusion. Les souches de RT638, inconnues avant 2022, représentent maintenant en France 4% des ribotypes circulants. La diffusion de ce clone est nationale et souvent associé à des épidémies.

*BERTHET C, MESA V, EHMIG M, COUTURIER J, STORDEUR F, BARBUT F ET groupe d'étude du RT638
Emergence nationale d'un clone épidémique de Clostridioides difficile : caractérisation clinique et microbiologique)
43^{ème} RICA, 16-17 décembre 2024. Communication orale*

Mise au point d'un test rapide de screening des souches de *C. difficile* résistante à la fidaxomicine

Les recommandations actuelles de traitement des infections à *C. difficile* placent la fidaxomicine comme antibiotique de 1^{ère} ligne. Son utilisation devient de plus en plus fréquente et le risque d'émergence de souche résistance pourrait ainsi augmenter (Marchandin *et al.*, JAC 2023). Le CNR a mis au point un test rapide de dépistage des souches résistantes à la fidaxomicine par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Il a confirmé en déterminant les CMI en milieu liquide sur microplaques que les souches ayant un diamètre < 19 mm sont résistantes.

Direction de thèse de sciences (Adriana BADILLA LOBO) avec le Dr Johanne 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*.

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, en révision

JOUANS C., STORDEUR F, FERREIRA C., BARBUT F.
Infections à *Clostridioides difficile* : Quelle conformité des prescriptions d'anti-infectieux ?
Hygiènes, 2024, soumis

Publications Internationales 2024-2025

COUTURIER J, DAVIES K, BARBUT F.
Ribotypes and New Virulent Strains Across Europe.
Adv Exp Med Biol. 2024; 1435:151-168.

HUNAUULT L, ENGLAND P, BARBUT F, IANNASCOLI B, GODON O, DEJARDIN F, THOMAS C, DUPUY B, GUO C, MACDONALD L, GOROCHOV G, STERLIN D, BRUHNS P.
A monoclonal antibody collection for *C. difficile* typing?
Gut Pathogen 2024 Jan 19;16(1):4.

KHANAFAER NL, FITZPATRICK F, BARBUT F, KRUTOVA M, DAVIES K, GUERY B, VANHEMS P.
Heterogeneity in practices to reduce the risk of transmission of *Clostridioides difficile* in healthcare settings: a survey of ESCMID Study Group for *Clostridioides difficile* (ESGCD) members.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2024 Feb 9. doi: 10.1007/s10096-024-04767-1.

GRANATA G, BARBUT F, PETROSILLO N.
Editorial: *Clostridioides difficile* infection.
Front Med (Lausanne). 2024 Feb 26;11:1372813. doi: 10.3389/fmed.2024.1372813. eCollection 2024. PMID: 38468753

BENECH N, BARBUT F, FITZPATRICK F, KRUTOVA M, DAVIES K, DRUART C, CORDAILLAT-SIMMONS M, HERITAGE J, GUERY B, KUIJPER E; ESGCD AND ESGHAMI.

Update on microbiota-derived therapies for recurrent *Clostridioides difficile* infections.

Clin Microbiol Infect. 2024 Apr;30(4):462-468. doi: 10.1016/j.cmi.2023.12.007. Epub 2023 Dec 14

DECOUSSER JW, BARBUT F, BARON R, PARNEIX P, LAVIGNE T, ROMANO-BERTRAND S,

Comments on the tolerance of *Clostridioides difficile* spores to disinfection with sodium hypochlorite disinfectant.

Microbiology (Reading). 2024 May;170(5):001435. doi: 10.1099/mic.0.001435. PMID: 38771011

GODMER A, GIAI GIANETTO Q, *LE NEINDRE K*, LATAPY V, BASTIDE M, EHMIG M, LALANDE V, VEZIRIS N, AUBRY A, BARBUT F, ECKERT C. Contribution of MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning including deep learning techniques for the detection of virulence factors of *Clostridioides difficile* strains.

Microb Biotechnol. 2024 Jun;17(6):e14478. doi: 10.1111/1751-7915.14478.

REYGNER J, DELANNOY J, BARBA-GOUDIABY M-T, GASC C, LEVAST B, GASCHET E, FERRARIS L, PAUL S, KAPEL N, WALIGORA-DUPRIET A-J, BARBUT F, THOMAS M, SCHWINTNER C, LAPERROUSAZ B, CORVAÑA N.

Reduction of product composition variability using pooled microbiome ecosystem therapy and consequence in two infectious murine models.

Appl Environ Microbiol. 2024 May 21;90(5):e0001624. doi: 10.1128/aem.00016-24. Epub 2024 Apr 23. PMID: 38651930.

MARTIN-VERSTRAETE I., ANJOU C, ROYER M., BERTRAND E, BREDON M., LE BRIS J., ALONSO SALGUEIRO I., CAULAT L., DUPUY B., BARBUT F, MORVAN C., AND ROLHION N.

Adaptation mechanisms of *Clostridioides difficile* to auranofin and its impact on human gut microbiota"

NPJ Biofilms Microbiomes. 2024 Sep 17;10(1):86. doi: 10.1038/s41522-024-00551-3. PMID: 39284817

CASSIR N., COUTURIER J., DELANOYE J., WOLFROMM A., KASSIS-CHIKHANI N., **BARBUT F.**

Gut microbiota composition and *Clostridioides difficile* infection: the potential protective role of *Faecalibacterium prausnitzii*

Gut Pathogens Reports 2024, accepté

BENECH N., CASSIR, N., ALRIC, L, BARBUT F; BATISTA R, BLEIBTREU A., BRIOT T., DAVIDO B., GALPÉRINE TK., JOLY AC., KAPEL N; MELCHIOR, C; MOSCA, A; NEBBAD, B; PIGNEUR, B. SCHNEIDER S., WASIAK M., SCANZI J., SOKOL H.

Impact of clinical and pharmacological parameters on faecal microbiota transplantation outcome in *Clostridioides difficile* infections: results of a 5-year French national survey

Clin Microbiol Infect. 2024 Apr;30(4):462-468. doi: 10.1016/j.cmi.2023.12.007. Epub 2023 Dec 14. PMID: 38101472

BENECH N, CASSIR N, GALPERINE T, ALRIC L, SCANZI J, SOKOL H; **French Fecal Transplant Group.**

Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection Can Be the Best Therapeutic Option in Severely Immunocompromised Patients Depending on a Case-by-Case Assessment of the Benefit-to-Risk Ratio.

Gastroenterology. 2024 Aug;167(3):627-628. doi: 10.1053/j.gastro.2024.04.022. Epub 2024 Apr 26. PMID: 38679396

2025 Publications en cours de révision ou soumises

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
J. Vet 2025, 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 2024, 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 2024, 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

NUTTENS C., FOUAD F., VANHEMS P., GAVAZZI G., BARBUT F., 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)
In preparation

Conférence sur invitation

BARBUT F.
Diagnostics of *C. difficile* infections - unanswered questions
8th International symposium on *Clostridioides difficile* (ICDS)
Bled, Slovénie, 17-20 septembre 2024

BARBUT F.,
Evaluation of GI Bacterial PLUS ELite MGB® Kit for the diagnosis of *Clostridioides difficile* infection (CDI)
Symposium Elitech
34th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 27-30 avril 2024, Barcelone.

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.,
Epidémiologie des infections à *Clostridioides difficile* : recommandations diagnostiques et thérapeutiques
Caen, 11 avril 2024

BARBUT F.,

Infections à *Clostridioides difficile*
Journées Régionales du Cpias Val de Loire,
Tours, 10 septembre 2024

BARBUT F.

Epidémiologie et diagnostic des infections à *C. difficile*
Webinaire, Mission nationale PRIMO, 7 novembre 2024

BARBUT F.

Actualités sur les infections à *C. difficile*
6^{ème} Journée Normande de prévention des IAS
Touques, 21 novembre 2024

BARBUT F.

Epidémiologie des infections à *C. difficile*
Symposium Tillots
43^{ème} RICAI, 16-17 décembre 2024.

Communications à des congrès

LEMAIRE A, MESA-SCHEIN V, BRIDOUX L, LE HELLO S, LEMEE L, PETRY S, BARBUT F. POQUET I.
Clostridioides difficile chez les Equidés et les patients en Normandie : évaluation de la diversité
génomique et de la transmission
Congres de la SFM, Microbes,
Lille, 7-9 octobre 2024 (Poster).

LENORMAND P, COADOU T, MALAYRAT C, HARDIT V, TRAN C, MALADEN V, EHMIG M., MA L., FILLON M., BARBUT F., FIRMESSE O et BIÈCHE-TERRIER C.
Caractérisation des risques liés à *Clostridium perfringens* et à *Clostridioides difficile* dans les
abattoirs bovins en France
27^{ème} édition du congrès international francophone des 3R
4-5 décembre 2024, Paris, France

CASSIR N., DELANNOY J., COUTURIER J., MOSTAGHAT I., BARBUT F.
Gut microbiota composition and *Clostridioides difficile* infection: the potential protective role
of *Faecalibacterium prausnitzii*
34th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 27-30 avril 2024, Barcelone.
P3576

LE MARÉCHAL C, POEZEVARA T., JAMBOU L., THOMAS R., ROUXEL S., EHMIG M., HUNEAU-SALAÜN
A., LE BOUQUIN S., COUTURIER J., FILLION M., FIRMESSE O., BARBUT F.
Detection and characterization of *Clostridioides difficile* in broiler slaughterhouses
8th International symposium on *Clostridioides difficile* (ICDS)
Bled, Slovénie, 17-20 septembre 2024
Poster

FILLION M., EHMIG M., CASSIR N., ECKERT C., DELAGE J., MOSTAGHAT I., BARBUT F.
Simultaneous evaluation of 12 immuno-enzymatic assays for the detection of glutamate
dehydrogenase (GDH) and toxins of *Clostridioides difficile*.
8th International symposium on *Clostridioides difficile* (ICDS)
Bled, Slovenia, 17-20 septembre 2024
Poster

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)

Bled, Slovenia, 17-20 septembre 2024

Poster 02063

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

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

Mentionnez ici les informations suivantes (pour les CNR concernés) :

- Existence d'une coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments dont les LNR (en précisant les laboratoires concernés) et les laboratoires environnementaux ;
- Domaines de coopération concernés : (i) Investigations autour des cas animaux, sources alimentaires ou environnementales susceptibles d'être éventuellement à l'origine de cas humain(s) ; (ii) Surveillance microbiologique ; (iii) Participation au Réseau de surveillance épidémiologique de la maladie en France ; (iv) Formations ; (v) Comparabilité des méthodes analytiques ; (vi) Compatibilité des bases de données ; (vii) Etudes communes ; (viii) Production d'expertise commune ;
- Échanges techniques entre le CNR et le LNR ; préciser leur type : échange de souches, de méthodes, ...

Précisez les perspectives et/ou conditions de renforcement de ces liens, notamment si des collaborations sont souhaitables mais non encore effectives.

ANR CLOSTABAT ("Characterization of the *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* hazards in the beef, pig and poultry sectors in slaughterhouses") soumise par le Dr O. FIRMESSE (département des contaminants microbiologiques, Laboratoire de sécurité des aliments) (2022-2025)

Ce projet de recherche vise à évaluer la contamination des élevages de bovins, volailles et porcins 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 des anaérobies 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.

Le laboratoire C. difficile associé au CNR des anaérobies est responsable du **WP4** relatif à la caractérisation des souches de C. difficile et C. perfringens

*LE MARÉCHAL C., POEZEVARA T., JAMBOU L., THOMAS R., ROUXEL S., EHMIG M., HUNEAU-SALAÜN A., LE BOUQUIN S., COUTURIER J., FILLION M., FIRMESSE O., **BARBUT F.***

Detection and characterization of Clostridioides difficile in broiler slaughterhouses

8th International symposium on Clostridioides difficile (ICDS)

Bled, Slovénie, 17-20 septembre 2024

Poster

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.

LEMAIRE A, MESA-SCHEIN V, BRIDOUX L, LE HELLO S, LEMEE L, PETRY S, **BARBUT F**, POQUET I.

Clostridioides difficile chez les Equidés et les patients en Normandie: évaluation de la diversité génomique et de la transmission

Congres de la SFM, Microbes,
Lille, 7-9 octobre 2024 (Poster).

LENORMAND P, COADOU T, MALAYRAT C, HARDIT V, TRAN C, MALADEN V, EHMIG M, MA L, FILLON M, **BARBUT F**, FIRMESSE O et BIÈCHE-TERRIER C.

Caractérisation des risques liés à *Clostridium perfringens* et à *Clostridioides difficile* dans les abattoirs bovins en France

27ème édition du congrès international francophone des 3R
4-5 décembre 2024, Paris, France

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 est de compléter le jeu de données de souches de *C. difficile* isolées de réservoirs environnementaux pour lesquels il y a peu de données disponibles actuellement de façon à renforcer les modèles d'attribution de sources qui seront appliquées.

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))

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 :

- i) 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
- ii) 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
- iii) 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

Programme d'activité pour les années suivante

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 le 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)

The general objective of the CDefenseRNA project is to decipher the original interplay between RNAbased defense systems CRISPR-Cas, TA and Abi and their contribution to the CD adaptation and interactions with phages. Our specific aims are to decipher:

- the roles and interplay of RNA-based defense systems in phage defense, regulatory processes, stress response and adaptation during infection;
- their mechanisms of action and molecular determinants for RNA interaction with associated protein machineries as targets for future inhibitory strategies;
- the evolutionary history, distribution, association with MGE and transfer by phages of RNA-based defense systems in bacteria.

Our hypothesis is that RNA-based defense systems are functionally linked in CD contributing to the evolution of the chromosome and fitness inside the host¹². The defense systems encoded in prophages should contribute to their spread within bacterial population.

Projet d'une étude de prévalence du clone RT638 en France

Nous avons précédemment montré que le clone RT638 était responsable d'épidémie dans différents ES et que sa fréquence augmentait régulièrement parmi les souches reçues au CNR. Notre objectif est de réaliser une étude « un jour donnée » pour analyser les selles positives à *C. difficile* en France afin d'estimer la proportion de RT 638 et mesurer dans sa diffusion nationale. L'objectif secondaire de cette étude serait de comparer la congruence de différents schémas de cgMLST (Enterobase, Bionumerics, SeqSphere). Ce projet sera mené par Muriel Ehmig, Ingénieur hospitalier, dans le cadre de son mémoire du DU de médecine génomique

Projet d'étude sur la fréquence de transmission intra-hospitalière de *C. difficile*

Les infections à *C. difficile* diagnostiquées à l'hôpital sont d'origine nosocomiale dans plus de 70% des cas. Nous souhaitons étudier sur une année le taux de transmission de *C. difficile* parmi les patients hospitalisés à saint Antoine en caractérisant toutes les souches par cgMLST. Ce projet sera mené par le Dr J. Couturier dans le cadre de son mémoire de DU de médecine génomique

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Rappelez ici les informations suivantes (pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature) en les mettant si nécessaire à jour :

Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.

Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

CNR *Clostridioides difficile*

Hôpital Saint-Antoine
Bâtiment Pierre Masson Porte 8 - 1er étage
34 rue Crozatier
75012 PARIS

Pr Frédéric Barbut +33 1 49 28 30 11 ou frederic.barbut@aphp.fr

Dr Jeanne Couturier +33 1 71 97 09 85 ou jeanne.couturier@aphp.fr

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

Personnel médical : 3 (ETP global : 0,7)

Personnel non médical : 4 (ETP global : 3,27)

Locaux et équipements

Le plan du service est représenté sur la **figure 1**.

Localisation :
Hôpital Saint-Antoine
Bâtiment Pierre Masson Porte 8 - 1er étage
34 rue Crozatier
75012 PARIS

- 1 Microscope
- 1 Electrophorèse champ pulsé (Gene Path, BioRad)
- 1 logiciel Bionumerics (Applied Maths)
- 1 logiciel GeneMapper
- 1 séquenceur ABI3500
- 1 spectrophotomètre 600nm (Biochrom)
- 3 Pipettes Multicanaux (Dutscher)
- 1 Multipette® électronique Eppendorf
- 1 McFarland

Collections de matériel biologique

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

Démarche qualité du laboratoire

Rappelez ici l'organisation mise en place par le CNR en termes de démarche qualité du laboratoire (accréditation, participation à un contrôle qualité externe, certification, ...).

Les techniques du CNR étant spécifiquement accréditées à échéance de l'année N doivent être mentionnées dans l'annexe 2.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

Liste des techniques de référence

*Listez ici les techniques (diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux, ...) utilisées par le CNR, **en mentionnant explicitement lesquelles sont accréditées à échéance de l'année N.***

Aucune des techniques mentionnées ci-dessous ne sont accréditées

Les techniques de référence disponibles pour la caractérisation des souches de C. difficile sont :

- *la détermination de la sensibilité à certains antibiotiques (érythromycine, clindamycine, métronidazole, moxifloxacin, tétracycline, vancomycine et fidaxomicine)*
- *la détection par PCR des gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire (détection de la forme complète et de la forme tronquée)*
- *la détection par PCR des fragments A3 du gène *tcdA* et B1 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B*
- *la détection par PCR des fragments A1 et A2 du gène *tcdA* et B2 et B3 du gène *tcdB*, gènes codant respectivement pour la toxine A et la toxine B, notamment pour la détermination de certains toxinotypes*
- *la détermination du toxinotype après restriction des fragments A3 et B1 par différentes enzymes de restriction.*
- *la 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) sont déterminés après amplification puis séparation par électrophorèse capillaire et comparaison à des souches témoins*
- *la détection simultanée de 7 cibles : *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*, *tcdC*, *tpi*, et un fragment retrouvé chez les souches non toxigènes, par PCR multiplex et détection par électrophorèse capillaire*

- le typage par PCR-ribotypage qui est actuellement la technique de référence en Europe permettant d'identifier le clone épidémique « 027 » et de comparer les souches entre elles lors d'une suspicion de cas groupés. La comparaison des profils de migration obtenus par électrophorèse capillaire se fait par rapport à la base de données WEBRIBO.
- l'amplification de l'ARN 16S, l'utilisation des galeries API rapid ID 32 A (Biomérieux) et la spectrométrie de masse (Maldi-TOF, Brücker) permettant l'identification de *C. difficile*
- l'amplification d'une 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*).
- le typage des souches par MLVA (Multilocus Variable-number tandem repeat Analysis) et MLST (MultiLocus Sequence Typing)
- le WGS et analyses des génomes par les méthodes du cg MLST, wgMLST et cgSNP

Liste des techniques recommandées par le CNR

Listez ici les techniques (diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux, ...) recommandées par le CNR aux autres laboratoires.

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

Cf PDF Annexe 3 CNR associé

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

Cf PDF Annexe 4 CNR associé