



Rapport annuel d'activité 2019

Centre National de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters-année d'exercice 2018

Responsable scientifique : Prof Philippe Lehours

Adjoints : Prof Francis Mégraud, Dr Emilie Bessède

Responsable administratif : Mr David Karle

CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin
Laboratoire de Bactériologie
33076 Bordeaux cedex

Sommaire

Résumé analytique (français)	3
Résumé analytique (anglais).....	4
1-Missions et organisation du CNR.....	5
2-Activités d'expertise	5
2.1-Évolutions des techniques	6
2.2-Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	7
2.3-Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2.4-Collections de matériel biologique	11
2.5-Activités d'expertise	14
2.6-Activités de séquençage	14
3-Activités de surveillance	16
3.1-Description du réseau de partenaires	16
3.1.1-Description du réseau de partenaires <i>Campylobacter</i>	16
3.1.2-Description du réseau de partenaires <i>Helicobacter pylori</i>	18
3.2-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	20
3.2.1-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à <i>Campylobacter sp</i> et bactéries apparentées.....	20
3.2.2-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à <i>H. pylori</i>	24
3.3-Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	25
3.3.1-Surveillance de la résistance des <i>Campylobacters</i> et bactéries apparentées aux anti-infectieux	25
3.3.2-Surveillance de la résistance de <i>H. pylori</i> aux anti-infectieux	30
3.4-Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	33
3.5-Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	33
4-Alerte.....	38
5-Activités de rétro-information, de formation et de conseil	39
5.1.-Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	39
5.2.-Conseil et expertise aux autorités sanitaires.....	41
5.3.-Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	41
6-Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	41
6.1.-Activités de recherche en cours lors de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	41
6.2.-Liste des publications et communications de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	45
7-Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	49
8-Programme d'activité pour les années suivantes.....	50
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	55
1.1.-Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	55
1.2.-Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	56
1.3.-Locaux et équipements	56
1.4.-Collections de matériel biologique.....	57
1.5.-Démarche qualité du laboratoire.....	58
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	59
2.1.-Liste des techniques de référence	59
2.2.-Liste des techniques recommandées par le CNR.....	59
Statistiques de fréquentation du site internet du CNR <i>Campylobacters-Hélicobacters</i> (www.cnrch.fr)	65

Résumé analytique (français)

L'entérite à *Campylobacter sp* a été révélée par les travaux de Butzler au début des années 70. Il est maintenant admis que c'est l'infection intestinale bactérienne la plus fréquente tant dans les pays développés que dans les pays en développement. L'incidence des infections à *Campylobacter* est en augmentation constante depuis 1991 et est maintenant largement supérieure à celle des Salmonelles.

Le CNR des *Campylobacters* a pour principale mission de surveiller l'épidémiologie des infections à *Campylobacter sp* en France notamment en terme d'espèces retrouvées en pathologie humaine et en terme de résistance aux antibiotiques. Nous participons à l'évaluation des réactifs commerciaux destinés au diagnostic de ces infections ainsi qu'à la formation des biologistes et cliniciens.

Nous travaillons avec un réseau de correspondants privés et hospitaliers qui acceptent de nous envoyer leurs souches accompagnées d'une feuille de demande récapitulant certaines données épidémiologiques et bactériologiques. L'activité *Campylobacter* a augmenté en 2018, en particulier l'activité de saisie déclarative sur internet des laboratoires inclus dans ce système.

Pour l'année 2018, *C. jejuni* reste l'espèce majoritairement isolée de selles suivie par *C. coli*. La troisième bactérie isolée majoritairement de selles n'est pas un *Campylobacter* mais *Arcobacter butzleri*. *C. fetus* reste l'espèce la plus invasive. Les travaux d'attribution de sources appliqués à *C. jejuni* démontrent que les souches non invasives isolées en France viennent majoritairement des ruminants et que les souches invasives de *C. jejuni* ont pour origine majoritairement la volaille. Les résistances aux antibiotiques restent stables par rapport à 2017. Enfin, le CNRCH a participé à la description d'une nouvelle espèce candidate du genre *Campylobacter*.

Helicobacter pylori a été cultivé pour la première fois en 1982. L'intérêt pour cette bactérie a augmenté progressivement durant la décennie 80 pour devenir très important dans la décennie suivante quand on a réalisé son rôle dans les maladies gastroduodénales. Il est maintenant avéré que l'infection à *H. pylori* est la cause essentielle de la maladie ulcéreuse. De plus, il s'agit de la première infection bactérienne à l'origine de cancers chez l'homme : 80 % des lymphomes gastriques du MALT sont dus à *H. pylori* et peuvent être guéris par éradication de cette bactérie (sauf aux stades trop avancés avec translocations associées), et en ce qui concerne les carcinomes gastriques distaux, il s'agit d'un facteur de risque majeur présent dans 90% des cas.

Depuis les années 90, des traitements efficaces se sont développés et des conférences de consensus se sont tenues sur tous les continents pour recommander quand et comment éradiquer cette bactérie.

Le CNR *Helicobacter* travaille avec un réseau de correspondants locaux et nationaux. L'activité *H. pylori* au CNRCH a très fortement augmenté en 2018. L'année 2018 a été marquée par une stabilisation de la résistance primaire aux macrolides, une augmentation des résistances aux fluoroquinolones et au métronidazole. *H. pylori* est toujours très sensible à l'amoxicilline et à la tétracycline. Nous démontrons également l'intérêt d'associer la recherche par culture de cette infection à une détection moléculaire de la bactérie et des mutations associées à la résistance aux macrolides. De nombreux correspondants souhaitent avoir des conseils thérapeutiques ainsi que des conseils concernant la culture et les conditions de réalisation des antibiogrammes de *H. pylori*. Le CNR répond systématiquement à ces demandes, des formations théoriques ou pratiques peuvent être organisées si besoin. Enfin, nous avons caractérisé en 2018 deux probables nouvelles espèces du genre *Helicobacter*.

Résumé analytique (anglais)

Campylobacter enteritis was revealed by Butzler's work in the early 1970s. It is now accepted that it is the most common bacterial intestinal infection in both developed and developing countries. The incidence of *Campylobacter* sp infections has been steadily increasing since 1991 and is now significantly higher than that of *Salmonella* sp.

The NRC for *Campylobacter*'s main mission is to monitor the epidemiology of *Campylobacter* sp infections in France, specifically in terms of species found in human and in terms of antibiotic resistance. We participate in the evaluation of commercial reagents for the diagnosis of these infections as well as the training of biologists and clinicians.

We work with a network of private laboratories and hospitals who agree to send us their strains along with a request form summarizing some epidemiological and bacteriological data. The *Campylobacter* activity increased in 2018, in particular the declarative activity of the laboratories belonging to the Campy-Internet network.

In 2018, *C. jejuni* remained the species mainly isolated from stools followed by *C. coli*. The third bacterium isolated mainly from stools is not a *Campylobacter* but *Arcobacter butzleri*. *C. fetus* remained the most invasive species. The source attribution work applied to *C. jejuni* demonstrated that the non-invasive strains isolated in France come predominantly from ruminants and that the invasive strains of *C. jejuni* originated mainly from poultry. Resistance to antibiotics remained stable compared to 2017. Finally, the CNRCH participated in the description of a new species of the genus *Campylobacter*.

Helicobacter pylori was first cultured in 1982. Interest in this bacterium increased gradually during the 1980s and became strong in the following decade when its role in gastroduodenal diseases was shown. It has now been shown that *H. pylori* infection is the main cause of peptic ulcer disease. In addition, it is the first bacterial infection causing cancer in humans: 80% of gastric MALT lymphomas are due to *H. pylori* and can be cured by eradication of this bacterium (except in stages too advanced with associated translocations), and for distal gastric carcinomas, this is a major risk factor present in 90% of cases.

Since the 1990s, effective treatments have been developed and consensus conferences have been proposed on all continents to recommend when and how to eradicate this bacterium.

The NRC for *Helicobacter* works with a network of local and national correspondents. The *H. pylori* activity increased very strongly in 2018. There is stabilization of the primary resistance to macrolides, an increase of resistance to fluoroquinolones and metronidazole. *H. pylori* is still very susceptible to amoxicillin and tetracycline. We also demonstrate the interest of coupling culture with molecular detection of the bacterium and mutations associated with macrolide resistance.

Many correspondents seek advice on eradication strategies as well as on the culture and conditions of *H. pylori* antibiograms. The NRC systematically responds to these requests, and theoretical or practical training can be organized on demand. Finally, we characterized in 2018 two new species of the genus *Helicobacter*.

1-Missions et organisation du CNR

Organigramme 2017-2021 actualisé au 1^{er} avril 2019

Fonction	Nom	Qualification	Statut
Responsable scientifique	Philippe Lehours	Ph., Dr. ès Sci	PU-PH
Responsable adjoint	Francis Mégraud	Ph., Dr Med	Pr Émérite, vacataire
Responsable adjoint	Emilie Bessède	Ph., Dr. ès Sci	MCU-PH
Ingénieur (IH)	Lucie Bénéjat	M2	CDD
Ingénieur (IH)	Quentin Jehanne	Master bio-info	CDD
Technicienne	Astrid Ducournau	BTS	CDD
Technicienne	Alice Buissonnière	BTS	CDD (80%)
Technicien(ne)	X (pool des techniciens du laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin)	BTS	CDI
Technicienne Qualité	Mélanie Lecoœur	BTS	CDI (50%)
Secrétaire	Erick Keisler	BTS	CDD (60%)

IH : ingénieur hospitalier ; Personnel recruté en 2018.

D'autres éléments relatifs à cette section sont disponibles en annexe 1 de ce rapport.

2-Activités d'expertise

Les techniques disponibles au CNR sont décrites en annexe 2 de ce rapport.

Nous ne mentionnons ici que les responsabilités scientifiques des biologistes responsables du CNR Campylobacters-Helicobacters, en insistant sur quelques éléments clés de l'année 2018.

Éléments clés 2018 :

-L'activité Campylobacters et *H. pylori* du CNRCH a augmenté nettement au cours de l'année 2018. Notre réseau de correspondants Campylobacter a été élargi nous permettant de couvrir plus largement le territoire français.

-Nous avons participé aux recommandations du CASFM concernant la réalisation des antibiogrammes de Campylobacters et *H. pylori*. Des discussions ont également été entamées en 2018 autour des recommandations concernant les bactéries du genre *Arcobacter*. Des modifications spécifiques pour ces bactéries ont été intégrées dans la version 1-2019.

-Le CNR a également proposé au CASFM pour le contrôle qualité (CQ) *Campylobacter jejuni* des valeurs cibles en diamètre et CMI. Nous avons été sollicités par de nombreux laboratoires confrontés à des problèmes de CQ pour *C. jejuni*. Ceci a motivé un travail d'évaluation des antibiogrammes sur géloses MHF commerciales.

-Nous avons évalué en 2018 des solutions alternatives à la gélose MH10% et MHF proposées dans le CASFM-EUCAST pour les antibiogrammes de *H. pylori*.

-Un protocole français de surveillance des résistances de *H. pylori* aux antibiotiques ainsi qu'un protocole de surveillance Européen ont été mis en place en 2018.

-Nous avons évalué les performances du BD MAX (Becton Dickinson) dans le diagnostic moléculaire syndromique des infections à Campylobacters.

-Nous avons participé avec IFREMER à la caractérisation d'une nouvelle espèce du genre *Campylobacter*, proche de

C. lari. Nous avons également caractérisé trois potentielles nouvelles espèces du genre *Helicobacter*.
-Nous avons développé courant 2018 les stratégies de NGS appliquées à l'attribution de sources des souches de *C. jejuni* invasives et non invasives, d'étude des marqueurs moléculaires de résistance aux antibiotiques des Arcobacters.
-Les biologistes du CNRCH ont été impliqués dans la co-organisation du 26^{ème} congrès du GEFH en janvier 2018 à Tours (F Mégraud, P Lehours, E Bessède) et du 31^{ème} congrès de l'European Helicobacter & Microbiota Study Group (EHMSG) (F Mégraud), qui s'est tenu à Kaunas en septembre 2018.
-Nous avons organisé en septembre 2018 la première journée des correspondants du CNRCH.

Responsabilités scientifiques :

-P Lehours

-Assistant Editeur de Frontiers in Microbiology
-Membre du CA du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters
-Membre du CA de la Société Française de Microbiologie

-F Mégraud

-Assistant Editeur du journal Helicobacter
-Membre du CA du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters
-Participation au Comité Scientifique de l'étude SAPHARY visant à surveiller les effets secondaires et la bismuthémie des patients traités par Pylera-IPP
-Membre du sous-comité de Taxonomie des Epsilonproteobactéries de l'International Union of Microbiological Societies
-Membre du comité Scientifique du journal Clinical Microbiology & Infection, de l'International Editorial Board de European Journal of Gastroenterology & Hepatology, et Senior Editor-Clinical de Gut Pathogens,

-E Bessède

-Membre du CA du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters

2.1-Évolutions des techniques

L'activité technique relative au diagnostic des infections à Campylobacters et Hélicobacters est restée stable par rapport aux années précédentes.

-Dans l'objectif d'accréditer la recherche de *H. pylori* par PCR en temps réel, une collaboration avec la société Eurogentec a été mise en place. Eurogentec a produit des barrettes de PCR prêtes à l'emploi en salle blanche, délivrées avec un CQ de validation. Seul l'ADN extrait à partir des biopsies est à rajouter dans le tube réactionnel. Nous avons continué en 2018 les tests nécessaires à l'adaptation de notre PCR de détection de *H. pylori* (et des mutations associées à la résistance aux macrolides) (Oleastro M, J Clin Microbiol 2003) avec ces réactifs. Ce nouveau conditionnement permet un gain de temps, et un meilleur contrôle des réactifs afin d'accréditer plus aisément cette PCR « maison ».

Afin d'identifier *H. pylori* par PCR en temps réel, l'ancienne méthode utilisait des capillaires (onéreux) dédiés au LightCycler (LC) 2.0, appareil de PCR en temps réel voué à disparaître. Les PCR en barrettes Eurogentec sont réalisées et analysées sur le LC480, disponible au plateau de biologie moléculaire du CHU. Afin d'adapter la PCR « maison » de détection de *H. pylori* du LC2.0 au LC480, le fluorophore LC640 a dû être modifié en ATT0647N, dont le signal est plus intense. Ce changement de fluorophore permet des détections plus précoces des cas positifs.

En parallèle de la PCR de détection *H. pylori*, la société Eurogentec a aidé à la conception d'une nouvelle PCR utilisant le gène de ménage β globine en format FRET (contrôle d'extraction et d'amplification) et en barrette, permettant ainsi de réaliser les 2 PCR *H. pylori* et β globine dans un même « run », ce qui constitue un gain de temps considérable.

Chaque lot de barrettes commandé est ainsi accompagné d'un contrôle qualité dont la durée de validité est de 1 an.

Afin de valider ce transfert de méthode de PCR, 61 extraits d'ADN ont été analysés et comparés par l'ancienne et la nouvelle méthode avec 100% de concordance :

Capillaires 2.0	Barrettes LC480	n=
<i>H. pylori</i> négatif	<i>H. pylori</i> négatif	25
<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Sensible	<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Sensible	17
<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Résistant	<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Résistant	3
<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Résistant/Sensible	<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Résistant/Sensible	16

Toutes les PCR de détection de *H. pylori* sont réalisées par cette technologie depuis février 2019.

-Nous avons mis à jour notre base d'identification MALDI-TOF sur automate Bruker, avec les spectres d'espèces proches de *C. lari* notamment *C. ornithocola* (décrite dans la littérature) et *C. armoricus* (publication en cours en collaboration avec IFREMER). Ceci nous permet donc maintenant une discrimination fine de ces espèces.

-Nous avons intégré courant 2018, la réalisation des sérologies *C. jejuni* par technique de réaction de fixation du complément suite à une réorganisation interne des activités du laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux.

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

Travaux relatifs aux infections à *Campylobacter sp*

1-Evaluation de kit ELISA *Campylobacter*, kit SERION ELISA classic *Campylobacter jejuni* IgG et SERION ELISA classic *Campylobacter jejuni* IgM (commercialisés par Orgentec) : par comparaison aux sérologies effectuées actuellement par réaction de fixation du complément (RFC), ces ELISA ont une bonne sensibilité et spécificité de détection des anticorps anti-*Campylobacter*. Nous avons rencontré des problèmes de répétabilité, qui n'ont pu être résolus, nous empêchant de passer en routine ces sérologies sur l'automate ETIMAX 3000. Aussi, les sérologies *C. jejuni* continuent d'être réalisées par RFC. Suite à une réorganisation des activités du laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux, ces sérologies sont maintenant réalisées par le personnel technique du CNRCH.

2-Évaluation de 3 géloses commerciales MHF pour les antibiogrammes de *C. jejuni* (application pratique à partir du CQ *Campylobacter jejuni*) :

Les conditions de réalisation des antibiogrammes des *Campylobacter*s sont bien définies dans les recommandations du CASFM-EUCAST. La gélose recommandée est le Mueller-Hinton complété avec 5% de sang de cheval défibriné mécaniquement + 20 mg/L β NAD. Plusieurs sociétés commercialisent en France ces géloses dites MH-F. Le CNR des *Campylobacter*s a été très sollicité en 2018 par de nombreux laboratoires signalant des problèmes rencontrés pour les contrôles qualités réalisés sur ces milieux avec la souche de CQ *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 recommandée.

Notre objectif a été d'évaluer les performances des milieux MH-F commercialisés par bioMérieux, Biorad et Becton Dickinson en parallèle aux géloses MH-F préparées au CNR en testant la souche de CQ pour *C. jejuni*.

La souche de *C. jejuni* ATCC 33560 a été testée à trois reprises sur chaque milieu et chaque condition expérimentale réalisée à la fois en disques (disques Biorad) et en CMI (Etest, bioMérieux). Les géloses MH-F du CNR ont été préparées selon la procédure recommandée par l'EUCAST avec 5% de sang de cheval. Pour chaque série de test, tous les milieux ont été ensemencés par inondation ou écouvillonnage avec une suspension ajustée à 0,5 McFarland, puis incubés en atmosphère microaérobie à 35°C ou 42°C pendant 24h. La lecture des CMI a été réalisée à l'œil par deux opérateurs et la lecture des diamètres à l'aide d'une caméra intégrée à l'automate SIRScan auto (I2A). Plusieurs lots de géloses ont été testés pour chaque fournisseur : Becton Dickinson : 81214001, 8166770, 8257827 Biorad : 64184399, 64198863, 64217497 ; bioMérieux : 1006445690, 1006568890, 1006620730.

Nos résultats démontrent que les performances des géloses MH-F commerciales pour *Campylobacter* sont très variables en fonction des conditions analytiques utilisées. Les résultats obtenus sont conformes aux valeurs du CQ à condition d'ensemencer les géloses par écouvillonnage. Contrairement aux recommandations de certains fournisseurs, elles doivent être incubées à 35°C et non 42°C afin d'obtenir des valeurs correctes.

Les bornes proposées pour certains antibiotiques devraient être réactualisées pour certaines molécules dans une prochaine version du CA-SFM. Les fiches techniques de certains fournisseurs devraient être modifiées.

3-Evaluation de BD MAX dans le diagnostic des infections digestives à *Campylobacter jejuni* :

De nombreux laboratoires de biologie s'équipent d'appareils de PCR syndromiques notamment dans le cadre du diagnostic de diarrhées infectieuses. Une stratégie consiste, pour le versant bactérien de ces approches, à n'ensemencer que les géloses sélectives à la recherche du ou des pathogènes détectés. La culture des *Campylobacter sp* peut être malheureusement faussement négative (Bessède E *et al.*, J Clin Microbiol 2018).

Le CNR Campylobacters a mis en place une collaboration avec deux laboratoires participant à son réseau de surveillance, situés dans le département 67 et 85, utilisant en screening avant culture la PCR BD MAX Enteric Bacterial Panel (Becton Dickinson).

L'objectif de notre étude a été de déterminer le statut *Campylobacter sp* des selles positives en PCR BD MAX mais négatives en culture.

Les 77 prélèvements inclus dans l'étude ont été reçus des laboratoires Bio67 (n=53, écouvillon en milieu Carry Blair) et CBM25 (n=24, selles). Tous les échantillons ont été acheminés congelés en carboglace au CNRCH avant analyse. Les tests réalisés au CNRCH étaient les suivants : culture sur milieu Campyloset (bioMérieux) avec ou sans enrichissement (Preston), à 35°C pendant 72h en atmosphère microaérobie ; extraction d'ADN sur automate Arrow (Norddiag) ; PCR temps réel du CNR pour *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus* (FRET), réalisée sur LightCycler 2.0 (Roche) (Ménard A *et al.*, CMI2005) ; PCR RIDAGENE Bacterial Stool Panel (r-biopharm), réalisée sur CFX96 (Biorad). Les résultats ont été évalués par rapport aux valeurs de Ct et d'intensité de fluorescence (IF) obtenues sur BD MAX. Les valeurs de Ct et d'IF obtenues par les deux laboratoires pour 80 cas positifs en culture ont également été récupérées.

33 des 77 échantillons étaient positifs pour les 2 formats de PCR testés au CNRCH (30 *C. jejuni* et 3 *C. coli*), et 37 étaient négatifs. Pour les 33 échantillons double-positif en PCR, les valeurs de Ct obtenus sur BD MAX étaient dans 93,9% inférieures à 30 Ct et les IF>2000 dans 97% des cas. Pour les 37 échantillons double-négatif en PCR, Les valeurs de Ct étaient inférieures à 30 dans seulement 18,39% des cas, les valeurs d'IF étaient supérieures à 2000 dans 40,5%. Pour comparaison, les 80 cas positifs en BD MAX et positifs en culture avaient des valeurs de Ct values <30 dans 96,2% et des IF>2000 dans 98,8% des cas.

Nous démontrons dans cette étude que les valeurs de Ct obtenues sur BD MAX peuvent aider à interpréter les résultats. La grande majorité des cas de *Campylobacter* détectés par culture ou avec les deux PCR de référence étaient positifs sur BD MAX avec une valeur de Ct <30, ce qui signifie que les selles détectées comme positives avec BD MAX et ayant une Ct > 30 pourraient être des faux positifs. Une interprétation clinico-biologique des résultats pourraient être mise en place dans les laboratoires utilisant cette stratégie en amont de la culture.

Travaux relatifs aux infections à *Helicobacter sp*

1- Evaluation de deux kits de détection des antigènes de *Helicobacter pylori* dans les selles : Pylori K-SeT et Pylori-Strip (Coris BioConcept) :

Le besoin en tests non invasifs fiables pour le diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori* est de plus en plus important. Parmi ces tests, ceux détectant les antigènes de *H. pylori* dans les selles sont en bonne place.

Le but de cette étude est de comparer la fiabilité (sensibilité et spécificité) du test Pylori K-SeT et du kit Pylori-Strip commercialisés par la compagnie Coris Bioconcept à une référence composite.

-Patients inclus et tests réalisés :

Les patients inclus par des gastroentérologues de Bordeaux ont bénéficié d'une fibroscopie pour obtenir des biopsies gastriques. Les selles ont également été prélevées quelques jours avant ou après la fibroscopie.

Les biopsies ont été broyées avec un pilon jetable dans un tube Eppendorf contenant 0,5 ml de bouillon.

Les tests suivants ont été réalisés sur ces biopsies (culture et PCR) et les tests Pylori K-SeT et Pylori-Strip ont été réalisés sur les selles pour recherche de *H. pylori* :

-Culture :

Elle a été effectuée sur milieu Pylori maison (Wilkins Chalgren enrichi de 10% de sang humain et rendu sélectif à l'aide des antibiotiques suivants : triméthoprime, cefsulodine, vancomycine et amphotéricine B) et milieu Pylori bioMérieux. Les boîtes ont été incubées en atmosphère microaérobie à 35°C et rendues négatives en l'absence de colonies suspectes après 10 jours. Les colonies suspectes ont été identifiées sur la base de la morphologie et de tests biochimiques (oxydase, catalase et uréase).

-PCR en temps réel :

La même suspension a été utilisée pour extraire l'ADN et réaliser une PCR en temps réel comme décrit par Oleastro *et al.* (J Clin Microbiol. 2003). Tous les broyats de biopsies sont gardés congelés à -80°C.

-Les tests immunochromatographiques :

Pylori K-SeT et Pylori-Strip ont été réalisés selon les recommandations du fabricant sur les selles gardées congelées

à -20°C. Nous disposons de 130 selles dont 35 positives selon la référence composite, à savoir, un patient est considéré *H. pylori* positif si la culture est positive ou en cas de culture négative si la PCR est positive.

La lecture des tests Pylori K-SeT a été effectuée de 3 manières différentes : 1) à l'œil, 2) à l'aide du lecteur aLF de Qiagen et 3) à l'aide du lecteur prototype Skan-Smart de Skannex selon les protocoles indiqués par Coris BioConcept ; Le test Pylori-Strip a été réalisé sur la même suspension de selles en trempant la bandelette correspondante et la lecture a été effectuée à l'œil.

En cas de discordance entre les tests immunochromatographiques et les tests de référence ou les tests immunochromatographiques effectués précédemment, ces derniers ont été refaits sur l'échantillon de selles pour vérifier qu'il ne s'agissait pas d'une perte de matériel antigénique dû à la congélation-décongélation des selles.

En résumé, les tests Pylori Coris BioConcept sont pratiques à utiliser et les lecteurs aident à définir les positifs en cas de résultats douteux. Le plus problématique reste la très faible sensibilité des kits et leur spécificité insuffisante. En effet, la performance intrinsèque des tests n'était pas excellente comparée à la culture ou aux résultats de la PCR :

-Pylori K-SeT, sensibilité 68,8% et spécificité 87% ;

-Pylori-Strip, sensibilité 54% et spécificité 94%.

Le lecteur aLf (Qiagen) améliorerait les performances de détection de *H. pylori* et semblait être équivalent au lecteur Skannex. La concordance entre la lecture visuelle et les lecteurs se situait autour de 89,1-93,1%.

2-Evaluation de la présence de double population (sensible + résistante) de *H. pylori* vis à vis de leur sensibilité aux macrolides au sein de biopsies gastriques par PCR temps réel

Deux CHU ont fait appel au CNRCH pour étudier des discordances dans la détection de la résistance aux macrolides de *H. pylori* lors de l'utilisation de trousse disponibles sur le marché : Amplidiag® *H. pylori*+ClariR de Mobidiag et RIDA®GENE *Helicobacter pylori* de R-biopharm.

Le CHU Henri Mondor (Créteil) a envoyé 4 extraits d'ADN issus de biopsies gastriques pour lesquels la trousse Amplidiag® ne détectait qu'une population *H. pylori* sensible à la clarithromycine, alors que l'antibiogramme de la souche indiquait une double population sensible et résistante.

Le CHU de Tours a envoyé un extrait d'ADN issu d'une biopsie gastrique pour lequel les 2 trousse Amplidiag® et RIDA®GENE indiquaient des résultats discordants pour la détermination de la résistance à la clarithromycine : Sensible pour RIDA®GENE, Sensible et Résistant pour Amplidiag®.

Notre PCR maison a détecté 3 double-populations WT+R sur les 4 échantillons du CHU Henri Mondor, échouant à détecter la 4ème double population, et a confirmé la double population de l'échantillon du CHU de Tours.

Nous avons aussi souhaité déterminer l'efficacité de détection des double-populations WT et R pour la clarithromycine par PCR en temps réel. Nous avons ainsi effectué des mélanges avec différents ratio de population de *H. pylori* WT et R pour la clarithromycine, et testé ces mélanges après extraction d'ADN avec notre PCR maison. Il s'avère que la population résistante n'est détectée que lorsqu'elle est en quantité importante : en dessous de 50%, la population R n'est pas détectable par notre PCR maison. Par contre, la population WT est détectable à des dilutions plus importantes.

Ces résultats ne remettent pas en cause l'intérêt de la PCR sous format temps réel maison ou commercialisée mais indiquent que l'efficacité d'amplification et de détection est supérieure pour les souches sensibles aux macrolides. De rares cas de discordances entre phénotype et génotype sont donc possibles en routine.

3-Evaluation des performances des géloses MHF pour les antibiogrammes de *H. pylori*

Le milieu utilisé couramment par le CNRCH pour effectuer un antibiogramme de *H. pylori* est la gélose Mueller Hinton, additionnée d'extrait de globules rouges et de 10% de sang de mouton (MH-10%). Les différences entre le milieu MH-F commercialisé et notre MH-10% interne sont le facteur de croissance, l'origine animale et la concentration du sang (β -NAD, cheval et 5% pour MH-F, respectivement).

Notre objectif était de comparer les CMI obtenues pour l'amoxicilline et la clarithromycine pour *H. pylori* sur le milieu MH-F, tel que recommandé par l'EUCAST, en particulier la gélose MH-F commercialisée par bioMérieux par rapport à notre MH-10% maison.

Les souches isolées en routine au CNRCH ont été testées en parallèle sur MH-F et MH-10% le même jour et selon le même protocole d'inoculation et d'incubation. Les milieux ont été inondés d'une suspension bactérienne à 3 McF, selon les recommandations du CASFM-EUCAST. L'amoxicilline a été testée sur 62 souches et la clarithromycine sur 77 souches par Etest (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). Les milieux ont été incubés à 35°C pendant 48 heures dans des conditions microaérobies (5% d'O₂, 10% de CO₂, 85% de N₂) (enceinte Ruskin Concept, Royaume-Uni).

Une discordance pour la catégorisation de l'amoxicilline a été trouvée dans 4,8% des souches. 58 souches étaient sensibles à la fois sur MH-F et MH-10%, 3 étaient sensibles (0,032 <CMI <0,125 mg / L) sur MH-10% mais résistantes sur MH-F (0,19 <CMI <0,38 mg / L), et 1 souche seulement était résistante sur les deux milieux (CMI = 0,5 mg/L)

Aucune discordance n'a été trouvée pour la catégorisation de la clarithromycine avec néanmoins des écarts de dilutions significatifs pour les souches résistances entre les milieux MHF et MH10%.

En conclusion, le milieu MH-F de bioMérieux pourrait être utilisé pour réaliser un antibiogramme de *H. pylori* pour ceux qui ne peuvent pas préparer leur propre gélose. Cependant, la lecture paraît difficile sur MH-F en raison d'une croissance insuffisante par rapport à MH-10%. Les divergences trouvées entre les CMI de la clarithromycine et de l'amoxicilline entre les deux milieux indiquent une nette influence de la composition du milieu même si cela n'a aucune influence sur la catégorisation finale des macrolides.

4-Evaluation des géloses Schaedler pour les antibiogrammes de *H. pylori*

Dans le but de proposer une gélose alternative aux géloses MHF (cf paragraphe ci-dessus) et à la gélose MH10% (non commercialisé), nous avons évalué, selon les recommandations du CNR des Hélicobacters Belge, les performances de la gélose Schaedler+hémimine+vitamine K1 (ref PB5034A, Thermo Fisher) pour les antibiogrammes de *H. pylori*.

Comme pour les essais de géloses MHF, 20 souches consécutives isolées en routine au CNRCH ont été testées en parallèle sur MH-F et MH-10% le même jour et selon le même protocole d'inoculation, d'incubation et de lecture. Les milieux ont été inondés d'une suspension bactérienne à 3 McF, selon les recommandations du CASFM-EUCAST.

Aucune discordance majeure n'a été relevée pour l'ensemble des antibiotiques testés (amoxicilline, clarithromycine, métronidazole, lévofloxacine, rifampicine, tétracycline). L'abondance de pousse était satisfaisante permettant une lecture sans hésitation des CMI (à l'exception des CMI rifampicine plus difficiles à interpréter).

Le laboratoire de référence de résistance aux antibiotiques de *H. pylori* du CHU NAMUR-Belgique (Pr Y. Glupczynski) a par ailleurs organisé en 2018 le CQ Ring test pour *H. pylori* : les CMI obtenues sur MH10% au CNRCH étaient conformes aux CMI attendues pour les souches envoyées et préalablement déterminées au CNR Belge sur gélose Schaedler+hémimine+vitamine K1.

En conclusion, la gélose commerciale Schaedler+hémimine+vitamine K1 peut être considérée comme une alternative pour réaliser des antibiogrammes de *H. pylori*. Nous utilisons depuis ces essais, en routine cette gélose en cas de problème de fabrication de nos géloses MH10%. Le CNRCH va proposer au CASFM-EUCAST d'intégrer cette gélose dans les recommandations.

2.3-Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous n'avons pas été sollicités pour transférer vers d'autres laboratoires nos techniques. Le personnel du CNR répond cependant systématiquement à toutes les demandes de conseils (mail ou téléphone) concernant le diagnostic des infections à Campylobacters et Helicobacters.

Nous avons mis à disposition sur le site du CNRCH une fiche technique pour la recherche de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques (https://www.cnrch.fr/wp-content/uploads/2018/11/FICHE-TECHNIQUE_-_CULTURE-HELICOBACTER-PYLORI.pdf) et une fiche concernant la culture des Campylobacters à partir de prélèvements de selles (<https://www.cnrch.fr/wp-content/uploads/2019/02/Fiche-technique-Culture-des-Campylobacters-et-bacte%CC%81ries-apparente%CC%81es-PL-EB-FM-Fev-2019.pdf>).

Les biologistes du CNRCH ont également participé activement à l'élaboration d'une fiche technique pour la recherche de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques mise en ligne début 2019 sur le site internet du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters (<http://www.helicobacter.fr/wp-content/uploads/2019/01/fiche-diagnostic-helicobacter-pylori-pour-le-site-internet-du-gef-h-1.pdf>).

Les biologistes du CNRCH ont rédigé deux chapitres l'un sur Campylobacter, l'autre sur *Helicobacter pylori* pour l'édition 2018 du référentiel de Microbiologie clinique (REMIC 6.1).

Les souches de CQ pour *C. jejuni* et *H. pylori* sont régulièrement envoyées sur demande et gratuitement aux laboratoires demandeurs.

Nous envoyons de manière ponctuelle aux sites demandeurs des milieux de transports pour l'envoi de biopsies gastriques destinées à la recherche de *H. pylori* en leur indiquant le protocole à suivre afin de mettre en place les

bonnes conditions préanalytiques dans leur site respectif : une fiche dédiée est accessible sur notre site internet (<https://www.cnrch.fr/wp-content/uploads/2011/03/IN-LAB-546-Fiche-technique-pour-le-conditionnement-de-l'envoi-de-biopsies-gastriques-l2.pdf>).

En 2018, nous avons répondu à 21 demandes d'envoi représentant 99 souches et 1 ADN de différentes espèces d'Epsilonprotéobactéries.

2.4-Collections de matériel biologique

Nous avons en 2018 entamé le transfert de 1867 souches de *Campylobacter* vers le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Bordeaux (CRB) des années 2002 à 2012.

Elles ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- espèces autres que *C. jejuni* et *C. coli* de 2002 à 2012
- *C. jejuni* et *C. coli* de 2002 à 2012 issus d'hémoculture
- souches isolées à partir d'autres prélèvements que les selles ou les hémocultures de 2002 à 2012

Les répartitions exactes du nombre de souches sont :

Critères	Laboratoires privés	Hôpitaux
Espèces autres que <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i>	596	879
<i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> issus d'hémoculture	63	204
Prélèvements autres que selles et hémoculture	22	103
Total	1867	

Ce transfert a pu avoir lieu grâce à une convention passée par l'ancien directeur scientifique, F Mégraud, et le CRB du CHU de Bordeaux pour le transfert de ces souches. Une convention est en cours d'étude pour 2019.

Le CNR conserve l'intégralité des isolats de *Campylobacters* et bactéries apparentées (*Arcobacters*, *Hélicobacters* entérohépatiques) de 2013 à 2019 (environ 5000 souches/année). Nous disposons également de l'intégralité des souches de *H. pylori* (n=4600 environ, depuis 1983).

Le CNR dispose d'une collection de souches type pour de nombreuses espèces du genre *Campylobacter sp* (n=13), *Arcobacter sp* (n=3) ou *Helicobacter sp* (n=18). Ces souches ou leur ADN sont disponibles gratuitement sur demande : cf Tableau suivant.

Collection de souches de référence du CNRCH

Espèce	Sous-espèce	CCUG	ATCC	CIP	NCTC	NADC	Autres
<i>Arcobacter butzleri</i>		30485	49616	103493	12481		
<i>Arcobacter butzleri</i>		34397B					
<i>Arcobacter butzleri</i>						3257	
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>		17801	43158	104014	11885		
<i>Arcobacter skirrowii</i>		10374	51132	103588			
<i>Campylobacter coli</i>		11283	33559	70.80	11366		
<i>Campylobacter coli</i>				68.25			
<i>Campylobacter concisus</i>		13144	33237	103757	11485		
<i>Campylobacter curvus</i>		13146	35224	103747	11649		
<i>Campylobacter curvus</i>		11644					
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>fetus</i>	6823A	27374	53.96	10842		
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>fetus</i>			A169			
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>venerealis</i>	33899	19438	68.29	10354		
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>venerealis</i>	33902		69.45			
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>venerealis</i>			54.19			
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	<i>lawsonii</i>			104686			
<i>Campylobacter iguaniorum</i>							SP3
<i>Campylobacter iguaniorum</i>							03.427
<i>Campylobacter iguaniorum</i>							
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>jejuni</i>	11284	33560	70.2	11351		
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>jejuni</i>	81.176					
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>jejuni</i>						260.94
<i>Campylobacter jejuni</i>		19506/682 4	700819	107370	11168		
<i>Campylobacter jejuni</i>		10937					
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hippurate neg						D 1712
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hippurate neg						D 1713
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>doylei</i>	24567	49349	103751	11951		
<i>Campylobacter lanienae</i>				106745			
<i>Campylobacter lari</i>		23947	35221	102722	11352		
<i>Campylobacter ornithocola</i>							LMG 29815
<i>Campylobacter showae</i>				103970			
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>	9728	35980	103749	11528		
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>	11289	33562	53.103	11367		
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			54.20			
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			54.22			
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			81.11			
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv fecalis</i>	12014					
<i>Campylobacter upsaliensis</i>		14913	43954	103681	11541		
<i>Helicobacter anseris</i>		52421					
<i>Helicobacter bilis</i>		38995	51630	104752T			

<i>Helicobacter bizzozeroni</i>		35545		105233T			
<i>Helicobacter brantae</i>		52420					
<i>Helicobacter burdigaliensis</i>							
<i>Helicobacter caesarodunensis</i>		68986		111406			DSMZ 105791
<i>Helicobacter canadensis</i>		47163	700948		13241		
<i>Helicobacter canadensis</i>					13242		
<i>Helicobacter canis</i>			51401	104753T	12739		
<i>Helicobacter cholecystus</i>			700242	105596			
<i>Helicobacter cinaedi</i>		15433		105369			
<i>Helicobacter fennelliae</i>			35683				
<i>Helicobacter fennelliae</i>					11613		CLO 441
<i>Helicobacter hepaticus</i>			51449				
<i>Helicobacter muridarum</i>		29262	49282	104248			
<i>Helicobacter mustelae</i>		25715	43772	103759T	12198		
<i>Helicobacter nemestrinae</i>		44615		104754			
<i>Helicobacter pametensis</i>		29255	51478	104249			
<i>Helicobacter pullorum</i>		33837	51801	104787	12824		
<i>Helicobacter pullorum</i>		33838	51802		12826		
<i>Helicobacter pullorum</i>		33839					
<i>Helicobacter pullorum</i>		33840					
<i>Helicobacter pullorum</i>		33842					
<i>Helicobacter pullorum</i>					13154		
<i>Helicobacter pullorum</i>					13156		
<i>Helicobacter pullorum</i>					13157		
<i>Helicobacter pylori</i>		17874	43504	103995	11637		
<i>Helicobacter pylori</i>		18943		101260			

2.5-Activités d'expertise

Activités d'expertise concernant les *Campylobacters*

Notre CNR travaille avec un réseau de 113 laboratoires privés et 77 laboratoires hospitaliers qui participent respectivement aux réseaux Campy.COM et Campy.HOP. Ces laboratoires nous envoient leurs souches par un système de transport organisé par le CNR. Vingt-cinq de ces correspondants (dont 9 hôpitaux (5 CHU, 4 CHG)) saisissent 9 souches isolées directement via un accès sécurisé et intégré au site internet du CNR (réseau Campy-Internet), et n'envoient que la 10^{ème} au CNR comme contrôle de qualité. Ce système est fonctionnel depuis 2012 avec accord de l'ex INVS. Des évolutions majeures ont été intégrées en 2018 au site de saisie afin de limiter les données incomplètes relevées par le passé (cf paragraphe 5.1).

Chaque souche reçue est identifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF et antibiogrammée selon les recommandations du CASFM puis conservée à -80°C. Les laboratoires participant au réseau Campy-Internet saisissent en ligne les données épidémiologiques à l'identique de celles demandées sur la fiche de renseignement accompagnant chaque souche. Nous exigeons qu'ils réalisent une identification MALDI-TOF et un antibiogramme conforme aux recommandations du CASFM-EUCAST sur gélose MHF afin de pouvoir intégrer leurs résultats dans l'épidémiologie des infections à *Campylobacter sp.*

Le tableau ci-dessous récapitule le nombre de souches reçues par les réseaux Campy.COM, Campy.HOP et (ou) saisies par le réseau Campy-Internet en 2018.

	Campy.HOP	Campy.COM	Campy-Internet	TOTAL
Nb.	1081	3073	3897	8051

La validation biologique est quotidienne (jours ouvrés). Aussi, le délai moyen de retour de résultat pour chaque souche est de 5 jours (sans compter le transfert du résultat papier par envoi postal).

Activités d'expertise concernant *H. pylori*

Le CNR travaille avec 52 correspondants extérieurs au CHU de Bordeaux (dont 33 hôpitaux et 5 cliniques privées), et les services du CHU de Bordeaux. Nous avons reçu des biopsies également de 13 laboratoires privés, 3 polycliniques et 1 cabinet de gastroentérologie.

Le tableau ci-dessous récapitule le nombre de biopsies reçues en 2018 par type de correspondants.

	CHU de Bordeaux	Externes	TOTAL
Nb.	205	1470	1675
%	12,2	87,8	

La validation biologique est réalisée les lundi, mercredi et vendredi (jours ouvrés) afin de respecter les délais de subcultures des souches, aussi le délai moyen de retour de résultat pour chaque souche est de 10 jours (sans compter le transfert du résultat papier par envoi postal).

2.6-Activités de séquençage

-Le CNRCH n'a pas eu en interne au CHU ou à l'université de Bordeaux accès à une plateforme de séquençage. L'acquisition d'un appareil de séquençage haut débit est toujours au stade de projet au CHU de Bordeaux. Le CHU de Bordeaux essaie en effet de mettre en place des outils adaptés pour répondre aux besoins de séquençage

moyen/haut/très haut débit dans le domaine de la santé. Le CNRCH a participé l'an dernier au dépôt d'un projet d'équipements pour le CHU de Bordeaux et les équipes de recherche associées pour des séquenceurs de moyen/haut débit (MySeq et Next Seq) au Conseil Régional Nouvelle Aquitaine dans le cadre de son AO recherche 2018. Ce projet a été retenu et les discussions sont en cours pour établir un calendrier et des modalités d'acquisition d'équipements. Dans ce projet est envisagé également un partenariat avec la société Integragen (Evry) notamment pour la production de séquences à très haut débit (exome, génome complet, RNASeq en particulier). Les volumes élevés pourraient justifier de l'installation d'une antenne d'Integragen à Bordeaux. En attendant la mise en place de ces projets, la plateforme de génomique fonctionnelle de l'Université de Bordeaux ne possède plus d'appareil de séquençage haut débit. La plateforme Génome-Transcriptome (INRA Bordeaux-Aquitaine, Cestas-Pierroton) est difficilement accessible en routine.

-Le CNR a recruté en janvier 2018 une ingénieure hospitalière en bioinformatique (Mme Elvire Berthenet). Elle a été remplacée en décembre 2018 par Mr Quentin Jehanne. Les analyses bioinformatiques de base (assemblage *de novo* notamment) ont été réalisées par les sociétés prestataires de service : Helixio (<http://www.helixio.fr/>) (Clermont Ferrand) fin2017-début 2018 et Integragen (www.integragen.com) (Evry) fin 2018-début 2019.

-Le CNR a fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique et épidémiologique afin notamment, de réaliser des attributions de sources pour *C. jejuni*, de caractériser de probables nouvelles espèces du genre *Helicobacter*, et de participer à la compréhension des mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries du genre *Arcobacter*.

-Un total de 246 souches a été envoyé sous forme d'extraits d'ADN en 2017 à la plate-forme de séquençage Helixio : 213 *Campylobacter jejuni*, 30 *Arcobacter butzleri* et 3 *Helicobacter sp.* Un projet de séquençage de 200 génomes de *Campylobacter coli* a débuté en 2018 : une première plaque de 96 ADN a été envoyée en décembre 2018 à la société Integragen. L'objectif pour *C. coli* est comme pour *C. jejuni* d'identifier des marqueurs génétiques permettant de réaliser de l'attribution de sources (cf projet 2019-2020).

-L'ADN des souches est extrait au CNR à partir de culots bactériens digérés à l'aide de l'extracteur "MagNA Pure 96" (Roche Diagnostics) et du kit "MagNA Pure 96 DNA and Viral NA SV Kit". Une quantification de l'ADN et une vérification de la pureté (ratios 260/280 et 260/230) sont réalisées par NanoDrop avant l'envoi.

Un dosage au Qubit et une vérification de la pureté par NanoDrop sont réalisés par les sociétés prestataires, Helixio et Integragen. Le séquençage est effectué selon le protocole "Paired-end sequencing" (Illumina) (avec les séquenceurs "NextSeq500" pour Helixio et "HiSeq4000" pour Integragen). Les bibliothèques sont obtenues à l'aide du kit "Nextera XT DNA Library Preparation Kit" (Illumina) à partir de 1 ng d'ADN.

Après réception des séquences au CNRCH, un contrôle qualité des séquences brutes (Forward et Reverse) est effectué avec le logiciel "FastQC v0.11.3" (Babraham Institute). Un assemblage *de novo* est ensuite réalisé avec le logiciel "SPAdes v3.10.1". Cet assemblage permet d'obtenir des séquences contiguës (appelées "contigs") plus ou moins longues. A partir de cet assemblage les contigs sont filtrés en fonction de leur «k-mer coverage» et de leur longueur pour ne garder que les contigs représentatifs et analysables en éliminant les impuretés. Cette étape est réalisée en utilisant un script interne. Les souches dont la majeure partie des contigs sont de mauvaise qualité ne sont pas utilisées pour la suite des analyses bioinformatiques et peuvent également être renvoyées à séquencer lors de futures commandes.

Les séquences conservées sont intégrées dans la base de données BIGSdb (<http://bigsdb.readthedocs.io/en/latest/>), accompagnées des métadonnées. Trois bases de données sont utilisées, selon le genre des souches : la base *Helicobacter*, la base *Campylobacter*, et la base Multispecies. Les outils implémentés dans BIGSdb permettent de typer les souches de *Campylobacter* par MLST, ou encore de produire des alignements en fonction du génome core ou des gènes MLST. Un accord d'échange a été établi avec notre collaborateur Sam Sheppard à l'université de Bath en Angleterre (<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/contacts/academics/sam-sheppard/index.html>) afin d'accéder aux bases spécifiques *Campylobacter* et *Helicobacter* et en particulier d'avoir accès aux séquences déposées notamment par le LNR *Campylobacter* à Ploufragan (<https://www.anses.fr/fr/content/campylobact%C3%A9riose-0>).

3-Activités de surveillance

Éléments clés en termes de surveillance pour l'année 2018

Le volume d'activité du CNR pour *Campylobacter sp* et *H. pylori* a augmenté de manière très significative. Le réseau de surveillance des Campylobacters a évolué en 2018 en intégrant au réseau de correspondants un plus grand nombre de laboratoires notamment sur des départements non couverts en 2017. Comme initié en 2017, l'activité privée pour *H. pylori* est en très forte progression pour 2018.

Les trois principales espèces de *Campylobacter sp* retrouvées chez l'homme sont *C. jejuni*, *C. coli* puis *Arcobacter butzleri*. En quatrième position on retrouve *C. fetus*. Pour la deuxième année consécutive, le nombre absolu de souches de *C. jejuni* isolées de façon d'hémoculture est plus important que *C. fetus*. On observe également une diversification des espèces invasives avec notamment quelques isolats invasifs de *A. butzleri* ce qui est nouveau. Les résistances aux antibiotiques chez *Campylobacter sp* sont stables par rapport à 2017.

Le pourcentage de résistance primaire à la clarithromycine chez *H. pylori* stagne à un niveau proche de 20% en 2018. Aucune résistance à la tétracycline n'a été retrouvée en France en 2018. Nous avons cependant participé à caractériser quelques souches résistantes à la tétracycline envoyées par le CNR Helicobacters Belge (Pr Y Glupczynski) (cf paragraphe 3.5). De rares cas de résistance à l'amoxicilline ont été identifiés et caractérisés.

3.1-Description du réseau de partenaires

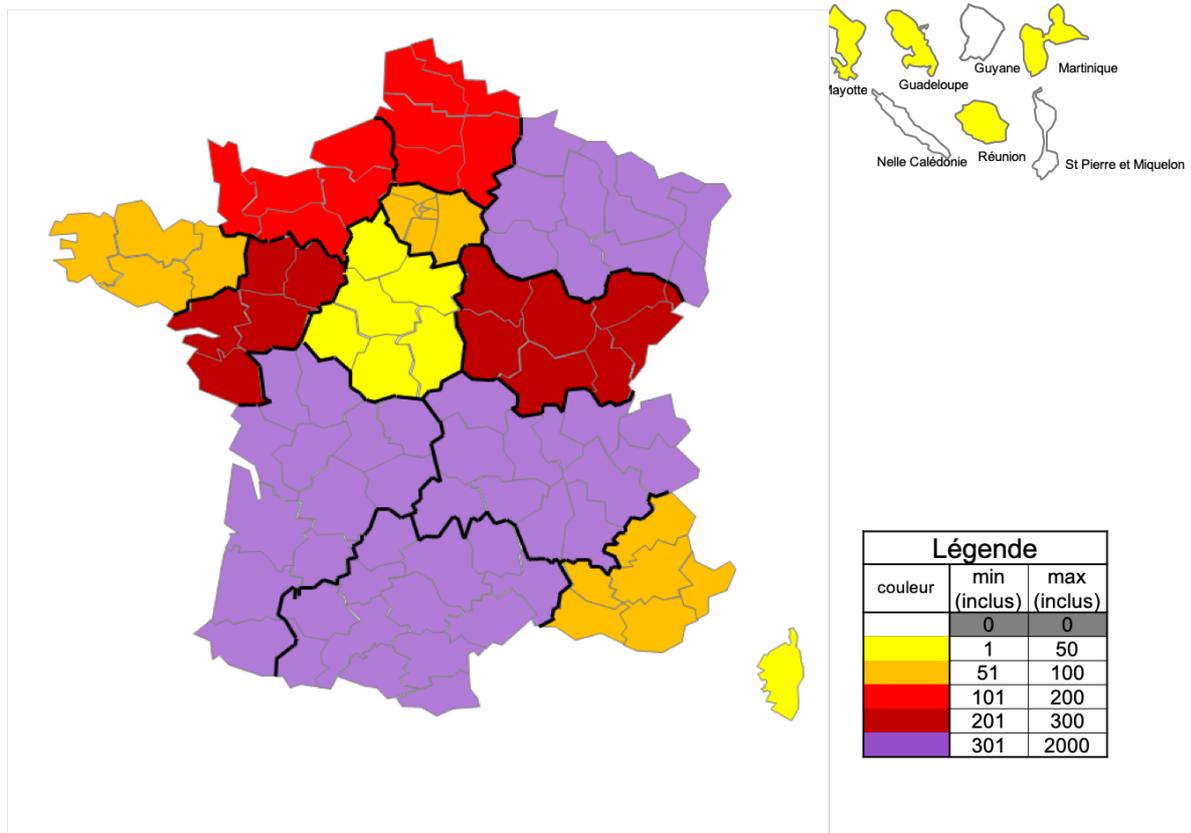
3.1.1-Description du réseau de partenaires *Campylobacter*

Comme indiqué précédemment, le CNR travaille avec un réseau de 113 laboratoires privés et 77 laboratoires hospitaliers qui participent respectivement aux réseaux Campy.COM et Campy.HOP : 25 de ces correspondants (dont 9 hôpitaux (5 CHU, 4 CHG)) participent également au réseau Campy-Internet.

Au total en 2018, nous répertorions 8051 souches de Campylobacters et bactéries apparentées. Les cartes de France ci-dessous (Figure 1) montrent la répartition par région et par département. En 2017, 23 départements et 4 DOM-TOM n'étaient pas couverts. Pour 2018, grâce à une campagne de mailing soutenue, notre réseau s'est étendu : seuls 6 départements et 3 DOM-TOM ne sont pas couverts.

Nous couvrons grâce à l'amplitude de répartition de nos correspondants toutes les régions de France dans leur nouvelle définition. La région Centre Val de Loire est la moins participative.

(A)



(B)

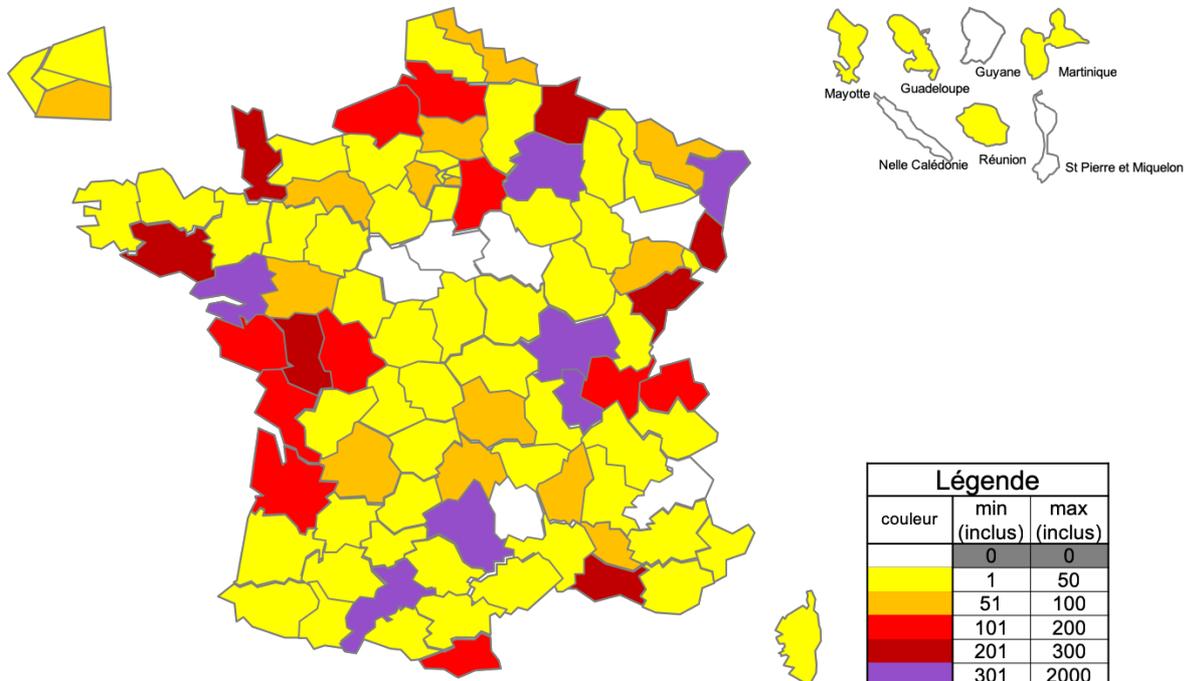


Figure 1. Répartition par région et par département des souches de Campylobacters reçues au CNR en 2018 des réseaux Campy.COM, Campy.HOP ou déclarées en ligne par le réseau Campy-Internet. (A)-répartition par région ; (B)-répartition par département. L'échelle de couleur a été choisie en fonction du nombre de souches.

-Evolutions du réseau par rapport à l'année 2018 :

Le nombre de souches répertoriées (viables ou non) en 2018 a augmenté par comparaison à 2017 (cf tableau ci-dessous), avec en particulier une augmentation importante du nombre de souches saisies sur le réseau Campy-Internet. Cette augmentation est liée en partie à l'ajout de 2 nouveaux correspondants dans ce réseau mais surtout à une augmentation globale de l'activité des 25 participants. Après enquête auprès d'eux, cette augmentation semble liée pour certains laboratoires à un élargissement de leur périmètre d'activité et à une augmentation du nombre de coprocultures réalisées en 2018.

	Campy.HOP	Campy.COM	Campy-Internet	TOTAL
Nb. en 2017	1060	3014	2968	7042
Nb. en 2018	1081	3073	3897	8051
Evolution en %	+1,98%	+1,96%	+31,3%	+14,3%

En 2018, notre réseau Campylobacter couvrait 89 départements et 4 DOM (contre 70 départements et 3 DOM en 2017). L'augmentation des saisies en ligne nous autorise pour 2019 à continuer à contacter les laboratoires privés et hospitaliers des zones non couvertes afin d'augmenter notre représentativité territoriale sans dépasser 5000 souches réceptionnées par an, chiffre au-delà duquel l'activité technique notamment saisonnière devient difficile à gérer par notre personnel (cf projet 2019-2020).

Nous avons également reçu 3 demandes de la part de l'hôpital Cochin (APHP, Paris) de recherche par ELISA de *Campylobacter* dans les selles de donneurs pour détection pré-transplantation fécale en 2018.

L'activité de sérologie *C. jejuni* a été transféré courant 2018 du laboratoire de Bactériologie hospitalier de routine vers le personnel technique du CNR. Cela représente environ 20 sérologies/mois.

3.1.2-Description du réseau de partenaires *Helicobacter pylori*

Le CNR a reçu 1792 prélèvements dont 117 tests respiratoires (provenant de 5 hôpitaux : dept 33-CHU Bordeaux (n=25) et CH Libourne (n=2), dept 75-Hôpital Cochin (n=36) et Hôpital Armand Trousseau (n=18), dept 51-CHU Reims (n=36)) et 1675 prélèvements (cf tableau ci-dessous) pour recherche de *Helicobacter pylori* de 52 correspondants extérieurs au CHU de Bordeaux (dont 33 hôpitaux et 5 cliniques privées), et des services du CHU de Bordeaux. Nous avons reçu des biopsies également de 13 laboratoires privés, 3 polycliniques et 1 cabinet de gastroentérologie. La carte de France ci-dessous (Figure 2) montre la répartition par département des prélèvements reçus en 2018 (tests respiratoires inclus) au CNR pour recherche d'infection à *H. pylori*. Nos correspondants étaient répartis sur 30 départements en 2018 *versus* 15 en 2017.

Prélèvements	2017	2018
Biopsies	980 (98,4%)	1663 (99,3%)
Souches	7 (0,7%)	3 (0,2%)
Selles	8 (0,8%)	9 (0,5%)
Autres	1 (0,1%)	0 (0%)
Total	996	1675

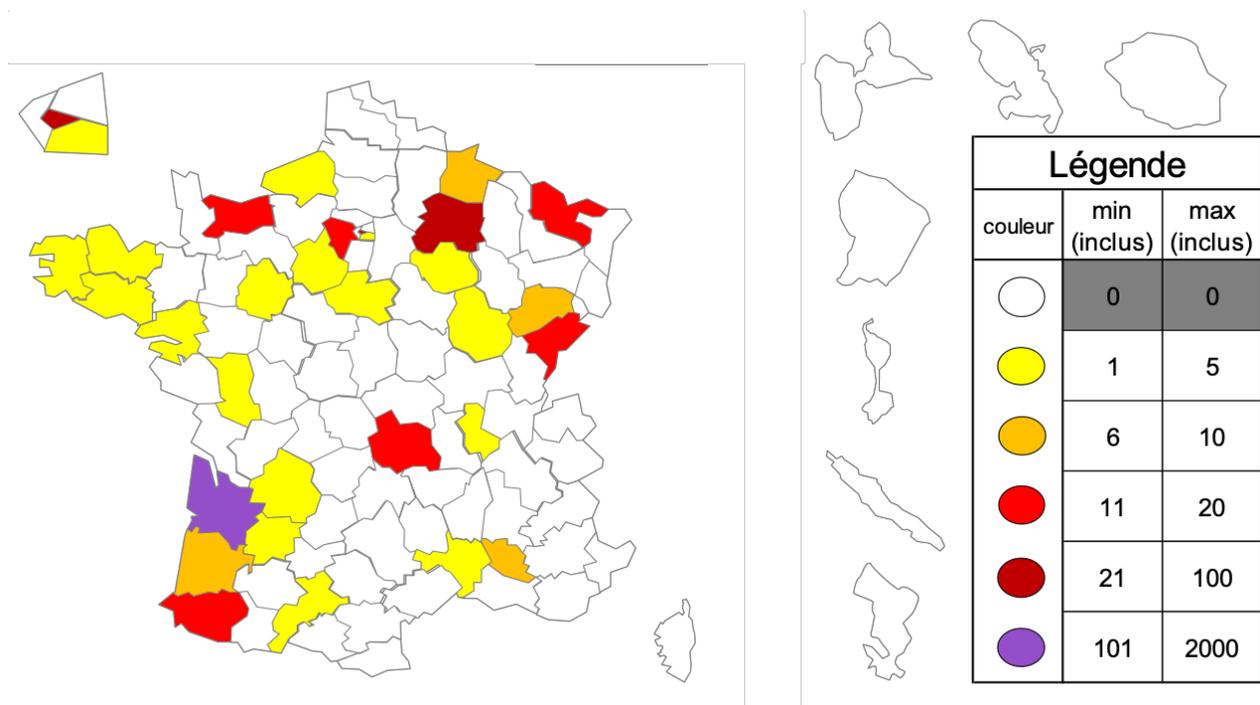


Figure 2. Répartition par département des biopsies gastriques et des tests respiratoires reçus au CNR en 2018 pour recherche d'infection à *Helicobacter pylori*. L'échelle de couleur a été choisie en fonction du nombre de prélèvements (n=1792 au total).

-Evolutions du réseau par rapport à l'année 2017 :

Par comparaison à 2017, notre activité concernant la recherche de *H. pylori* par culture et PCR a très fortement augmenté.

	CHU de Bordeaux	Externes	TOTAL
Nb. en 2017	335	687	1022
Nb. en 2018	205	1470	1675
Évolution en %	-39%	+114%	+64%

Cette augmentation très importante de notre activité est liée à des correspondants externes au CHU de Bordeaux qui représentent 87,8% en 2018 contre 67,2% en 2017.

Ceci est dû à deux facteurs :

-une augmentation très importante de l'activité d'endoscopie digestive de deux grosses cliniques privées sur Bordeaux et sa périphérie (Polyclinique de Bordeaux et Clinique des Quatre Pavillons) qui nous envoient leurs biopsies par l'intermédiaire des laboratoires privés gérant leurs prélèvements ;

-une diminution de l'activité d'endoscopie digestive au CHU de Bordeaux (réalisée au Centre Médico Chirurgical Magellan, hôpital Haut Lévêque).

Nous recevons essentiellement des biopsies gastriques (99,3%), rarement des souches isolées ou des selles (respectivement 0,2 et 0,5% pour chaque).

Nous réalisons dans la majorité des cas des cultures associées à une PCR de détection de *H. pylori* et de ses résistances aux macrolides. La PCR seule est réalisée sur les selles ou en cas de non-respect des conditions de transport des biopsies gastriques rendant impossible toute culture. La culture a parfois été réalisée seule (sans PCR associée) à cause de problèmes techniques. Ceci est stable par rapport à 2017.

Nombre d'analyses (par technique)	2017	2018
Culture + PCR	973 (97,7%)	1647 (98,3%)
PCR seule	19 (1,9%)	20 (1,2%)
Culture seule	4 (0,4%)	8 (0,5%)
Total (Culture et/ou PCR)	996	1675

Si l'on se base sur les résultats de la culture et/ou de la PCR, un quart environ des prélèvements sont positifs pour *H. pylori*. Ceci est stable par rapport à 2017.

Nombre d'analyses	HP positif 2017	HP positif 2018
Par culture et PCR	261/973 (26,8%)	459/1647 (27,9%)
Par PCR seule	6/19 (31,6%)	4/20 (20%)
Par culture seule	0/4 (0%)	1/8 (12,5%)
Total	267/996 (26,8%)	464/1675 (24,7%)

Le nombre de tests respiratoires reçus en 2018 est en augmentation de 12,5% versus 2017.

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

3.2.1-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à *Campylobacter sp* et bactéries apparentées

Contrairement aux années précédentes, les données seront présentées de manière globale en intégrant les données des réseaux Campy.HOP, Campy.COM et Campy-Internet. Les différences notables entre ces réseaux seront notées si besoin pour chaque sous-section.

- Résultats globaux :

Nombre de souches répertoriées (viables ou non) : 8051*

Nombre de souches ayant pu être étudiées dans les locaux du CNR : 4154**

370 souches/4154 (8,9%) n'ont pas donné de subcultures soit 3784 souches viables. Cette proportion est stable par rapport aux années précédentes.

*(3897 saisies en ligne pour le réseau Campy-Internet), ** dont 42 double populations (mélange de souches d'antibiotypes différents ou d'espèces différentes)

- Répartition par espèce et par nature de prélèvements :

Cette répartition sera basée sur 7681 isolats : 3784 reçus au CNR et 3897 saisies en ligne.

Les trois principales espèces répertoriées sont *C. jejuni* (83,3%), *C. coli* (13,5%) et *Arcobacter butzleri* (1,2%). *C. fetus* arrive en 4^{ème} position en 2018 (1,2%) (Tableau 1 et Tableau 2). *C. jejuni* et *C. coli* sont majoritairement isolés de selles : 98,7 et 98,6% respectivement. *C. jejuni* dépasse pour la deuxième année consécutive en nombre absolu *C.*

Tableau 1 : Répartition par espèce et par nature de prélèvements des Campylobacters et bactéries apparentées pour l'année 2018. Pour les 16 *Campylobacter sp* : 2 souches non identifiées dans le réseau Campy-Internet ; 2 *C. ureolyticus* ; 5 *C. hyointestinalis* ; 1 *C. peloridis* ; 3 *C. concisus* ; 1 *C. rectus* ; 2 *C. ornithocola*. Pour les *Helicobacter sp* : 4 *H. pullorum*, 2 *H. cinaedi*.

Nature	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sang	73	14	3	52	2	2	0	2	2	150
Selles	6316	1022	89	32	18	8	11	13	4	7513
Biopsies	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Autres	6	0	0	5	0	0	0	1	0	12
Total	6401	1036	92	89	20	10	11	16	6	7681
%	83,3	13,5	1,2	1,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	100,0

Tableau 2 : Répartition en pourcentage des espèces par nature de prélèvements des Campylobacters et bactéries apparentées pour l'année 2018.

Nature	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Moy %
Sang	1,1	1,4	3,3	58,4	10,0	20,0	0,0	12,5	33,3	2,0
Selles	98,7	98,6	96,7	36,0	90,0	80,0	100,0	81,3	66,7	97,8
Biopsies	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Autres	0,1	0,0	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,2

fetus comme espèce isolée de flacons d'hémocultures même si cela ne concerne que 1,1% des isolats de *C. jejuni* versus 58,4% des *C. fetus*. *A. butzleri* est majoritairement isolé de selles (96,7%) même si quelques isolats invasifs ont été répertoriés en 2018 (3,3%). Les isolats de *C. lari* et *C. upsaliensis* sont rares mais en proportion non négligeable en provenance d'hémoculture (respectivement 10% et 20%). Six *Helicobacter* sp (4 *H. pullorum*, 2 *H. cinaedi*) sont répertoriées en 2018.

La proportion de *C. fetus* diffère en fonction des réseaux : elle est de 3,51% pour le réseau Campy.HOP alors qu'elle est de 0,50% pour le réseau Campy.COM.

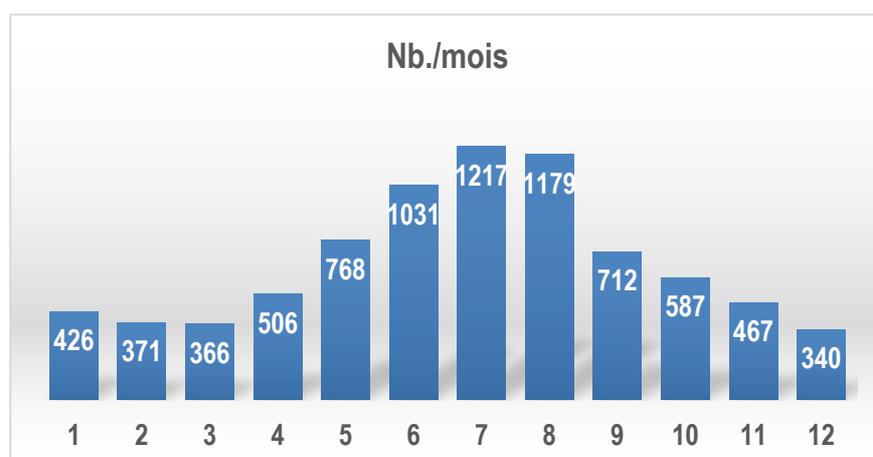
La proportion de souches invasives de *C. jejuni* est également plus importante au sein du réseau Campy.HOP (3,3%) versus Campy.COM (0,28%).

Lorsque l'information était disponible, nous n'avons relevé que peu de discordances (18 cas seulement) entre l'identification fournie par le correspondant et celle du CNRCH obtenue par MALDI-TOF Bruker. Tous ces cas ont été signalés sur le compte rendu de résultats et sont pour la plupart des discordances liées à l'utilisation d'automate d'identification en milieu liquide automatisé type Vitek-2 (bioMérieux).

Discordances	18
<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	13
<i>C. fetus</i> / <i>C. jejuni</i>	2
<i>C. fetus</i> / <i>C. coli</i>	1
<i>C. coli</i> / <i>A. butzleri</i>	2

- Répartition mensuelle des souches isolées :

Le graphique ci-dessous indique le nombre de souches répertoriées au cours de l'année 2018 pour l'ensemble des réseaux.



Ces données confirment la saisonnalité habituelle des infections à Campylobacters. Même si nous recevons des souches tout au long de l'année, les mois de Mai à Septembre regroupent 61,6% des souches répertoriées en 2018.

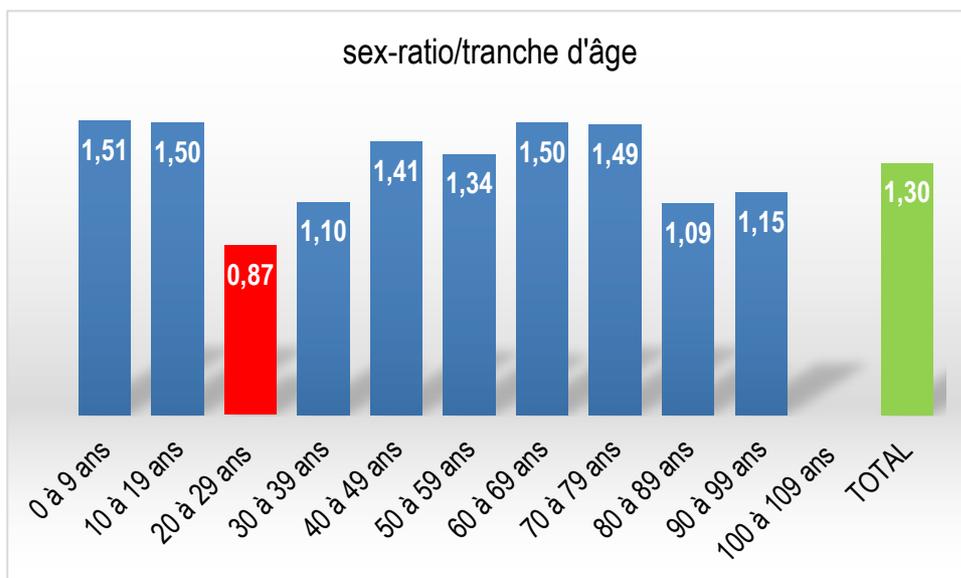
- Répartition par sexe :

Les chiffres ci-dessous tiennent compte des 8051 souches répertoriées (viables ou non).

Sexe masculin	4548	56,5 %
Sexe féminin	3503	43,5 %

La prédominance masculine est toujours marquée (sex-ratio H/F : 1,3 en moyenne).

Cette répartition est valable pour de nombreuses tranches d'âge sauf pour les 20-29 ans (0,87). Ceci témoigne probablement de l'exposition plus fréquente des femmes lorsqu'elles sont en âge d'avoir des enfants (cf graphique ci-dessous).



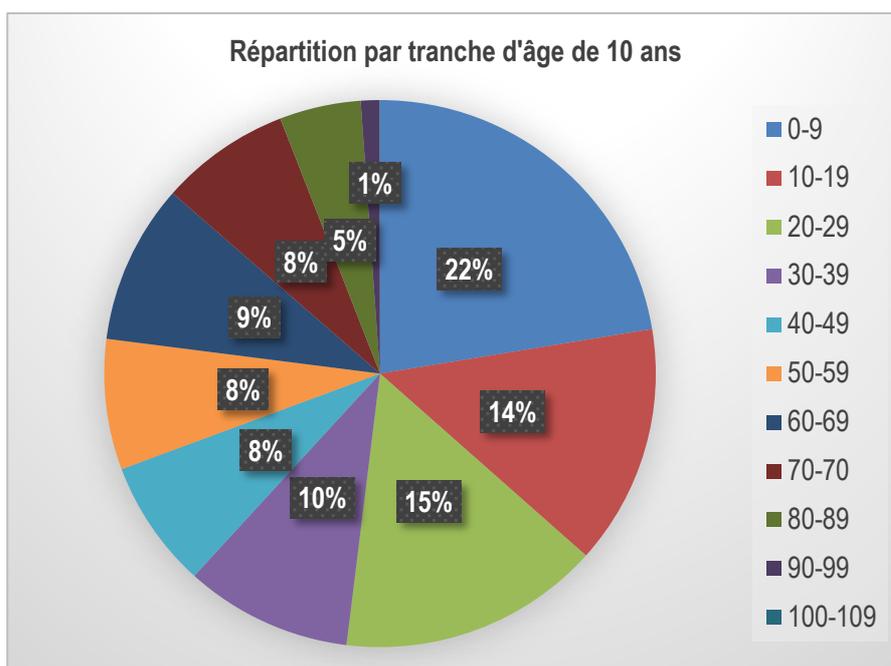
- Répartition par âge :

Catégories d'âges :

	COM	%	HOP	%	TOTAL	%
Adultes, ≥15 ans	4630	73,56	1099	62,55	5729	71,2
Enfants, <15 ans et ≥1 an	1560	24,79	524	29,82	2084	25,9
Nourrissons <12 mois et ≥1 mois	101	1,60	109	6,20	210	2,6
Nouveaux nés <1 mois	3	0,05	25	1,42	28	0,35
Total (Nb.)	6294		1757		8051	

Les infections à *Campylobacters* touchent toutes les tranches d'âge avec 28,9% de cas pédiatriques. Cette répartition est stable. La proportion de nourrissons est plus importante au sein du réseau Campy.HOP (37,4% *versus* 26,4%).

Tranches d'âges :



La tranche d'âge 0-29 ans représente 51,9% des infections à *Campylobacter* sp.

La répartition en pourcentage par tranches d'âge et au sein des trois réseaux est récapitulée dans le tableau ci-dessous.

	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-70	80-89	90-99	100-109
Total (%)	22,39	14,18	15,36	9,81	7,56	7,71	9,43	7,65	4,77	1,09	0,02
Campy .COM	20,29	13,81	16,21	11,04	8,53	8,33	9,79	7,15	4,16	0,68	0,02
Campy .HOP	29,94	15,54	12,35	5,41	4,10	5,52	9,43	9,45	6,94	2,56	0,06

La proportion de cas très âgés (supérieurs à 70 ans) est plus élevée au sein du réseau Campy.HOP, et comme évoqué ci-dessus la proportion de cas pédiatriques également (données grisées dans le tableau ci-dessus).

- **Répartition en fonction du type de malade** : Les données présentées ci-dessous concernent le réseau Campy.HOP, Campy.COM et Campy-Internet (soit 8051 souches).

Hospitalisation	n=300	3,73%
Consultation	n=5755	71,48%
Non précisé	n=1996	24,79%

- **Voyage à l'étranger** : Une notion de voyage à l'étranger a été renseignée (Oui/Non) dans 3448 cas sur 8051 cas. Le pays où la région du monde a été précisé dans 371 cas. Les principales régions concernées étaient l'Europe, l'Afrique et l'Asie (cf tableau ci-dessous).

Régions du monde	Nombre de cas	Détails
Europe	130	dont Espagne (41), Portugal (21), Italie (21)
Afrique	115	dont Afrique du Nord (88)
Asie	32	
Inde Indonésie	29	
Amérique du Nord	9	
Amérique du Sud et Centrale	13	
Caraïbe	11	
Océanie	4	
Autres	10	dont 9 non renseignés
Proche et Moyen Orient	10	
Iles océan indien	8	
TOTAL	371	

- **Contexte épidémique** :

Cas isolés	3866	48,02 %
Cas groupés	204*	2,53 %
Non précisé	3891	49,45 %

*161 cas familiaux, 29 cas en collectivités, 14 non renseignés.

Les infections à *Campylobacters* et bactéries apparentées sont donc principalement des cas isolés (lorsque l'information est disponible). Les cas groupés sont essentiellement familiaux, 31% d'entre eux surviennent entre mai et septembre. En 2018, 9 cas groupés (8 à *C. jejuni*, 1 à *C. coli*) ayant concernés de 2 à 3 malades (8 cas familiaux, 1 cas de TIAC) ont été confirmés par RAPD.

- **Origine supposée de la contamination** : L'origine alimentaire supposée de la contamination était précisée dans 151 cas/8051 (1,9%) (131 *C. jejuni*, 16 *C. coli*, 1 *Campylobacter sp.*, 1 *A. butzleri*, 2 souches mortes) et provenait majoritairement des volailles (21,2%) et des viandes (24,4%). Un contexte de contamination suite à un repas pris en restaurant est également fréquemment rapporté (26,5%). Le tableau ci-dessous récapitule les principales sources mentionnées.

Pour les 8 des 20 cas (40%) d'infections à *C. lari* (cf Tableau 1), espèce classiquement retrouvée dans le tube digestif des oiseaux côtiers (mouettes, sternes, etc...), le code postal du laboratoire expéditeur correspond effectivement à un département côtier laissant supposer une contamination possible *via* ces fientes d'oiseaux.

3.2.2-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à *H. pylori*

-Répartition par classe d'âge et sex-ratio des patients positifs à *H. pylori* (culture + PCR)

Nombre de patients (<i>H. pylori</i> positifs)	0-9 ans	10-19 ans	20-29 ans	30-39 ans	40-49 ans	50-59 ans	60-69 ans	70-79 ans	80-89 ans	90-99 ans	Total
Hommes	2	8	15	45	39	32	30	21	5	0	197
Femmes	2	19	21	53	68	41	38	20	6	1	269
Total	4	27	36	98	107	73	68	41	11	1	466
sex-ratio H/F (<i>H. pylori</i> positifs)	1	0,42	0,71	0,85	0,57	0,78	0,79	1,05	0,83	/	0,73

La moyenne d'âge des cas positifs est de 45,7 ans. Cependant, la majorité des cas positifs (74,1%) a entre 30 et 69 ans, majoritairement des femmes dans la quasi intégralité des tranches d'âge.

-Pour les 117 tests respiratoires reçus en 2018, le sex-ratio H/F (tous résultats confondus) était de 0,89 et la moyenne d'âge de 41,2 ans.

-Corrélation Culture et PCR

La culture de *H. pylori* est réalisée sur gélose *H. pylori* préparée au CNR et sur gélose commerciale Pylori (bioMérieux). La PCR est réalisée selon la technique publiée en 2003 (Oleastro *et al.*, J Clin Microbiol).

La concordance entre culture et PCR est montrée ci-dessous pour 2017 et 2018.

Culture	PCR	Nombre d'analyses 2017	Nombre d'analyses 2018
+	+	235/973 (24,5%)	398/1647 (24,2%)
-	+	26/973 (2,7%)	61/1647 (3,7%)
-	-	712/973 (73,2%)	1188/1647 (72,1%)

La culture de *H. pylori* a sous-estimé 3,7% des infections par rapport à la PCR. Ce résultat témoigne d'un bon contrôle des conditions analytiques et préanalytiques. Nous avons en effet mis en place les transports internes et externes au CHU de Bordeaux en milieu de transport (Portagerm Pylori, bioMérieux) de manière systématique.

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

3.3.1-Surveillance de la résistance des Campylobacters et bactéries apparentées aux anti-infectieux

Tous les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations du CA-SFM : milieu MH-F 5% sang de mouton, inoculum 0,5 McF, inondation, incubation à 35°C en atmosphère microaérobie en jarre (génération d'atmosphère à l'aide d'un Anoxomat (Smart)). La lecture à 24h (ou 48h) a été effectuée à l'aide de l'automate SIRScan (société I2A) puis vérification visuelle des diamètres lus à la caméra. La majorité des antibiogrammes est réalisée par la méthode de diffusion en disque (société BioRad). Des déterminations de CMI par Etest peuvent être réalisées si besoin.

Un CQ est effectué à chaque changement de lot de gélose MH-F, une trace des valeurs du CQ est stockée dans la base du serveur SIRWeb. Un biologiste vérifie systématiquement les valeurs lues.

A la validation, toute discordance avec le résultat signalé par le correspondant est vérifiée et si besoin signalée sur le compte rendu final.

Les pourcentages de résistance signalés ci-dessous tiennent compte des valeurs de diamètres critiques ou concentrations critiques telles que définies dans le CA-SFM 2018. Nous indiquons les résultats obtenus pour les principales espèces identifiées en 2018 : *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. lari* et *Campylobacter sp.* Les distributions de diamètres pour *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus* sont présentées dans les Figures 3 à 4. Pour les bactéries du genre *Arcobacter sp* nous indiquons les résultats obtenus pour les 2 espèces combinées (*A. butzleri* et *A. cryaerophilus*) (Tableaux 3-8) et seulement pour l'ampicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, la ciprofloxacine et la gentamicine. Les valeurs utilisées sont celles des Entérobactéries (cf CA-SFM 2019). En l'absence de « cut-offs » épidémiologiques adaptés pour catégoriser l'érythromycine et la tétracycline, ces données ne sont pas présentées dans le rapport 2018. Le CNR travaille sur ce sujet (cf paragraphe 6.1). Les distributions de diamètres d'inhibition pour *Arcobacter sp* sont présentées Figure 5.

Les valeurs obtenues pour les réseaux Campy.COM et Campy.HOP (en incluant pour chacun les données Campy.Internet) sont affichées ainsi que l'estimation générale de résistance pour chaque molécule testée. Dans ce calcul, seules sont considérées les valeurs des souches reçues viables au CNR ou renseignées pour les deux réseaux. La présentation des deux réseaux simultanément permet de comparer les pourcentages de résistance entre les réseaux Campy.COM et Campy.HOP.

La résistance à l'ampicilline reste stable pour *C. jejuni* et *C. coli* : comme par le passé, la résistance est plus élevée chez *C. jejuni*. *C. fetus* reste très sensible. Ceci est conforme aux années précédentes, tout comme la quasi absence de résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique.

La résistance à la ciprofloxacine dépasse 50% pour *C. jejuni* et approche les 70% pour *C. coli*. Il n'y a pas de différence entre les réseaux Campy.COM et Campy.HOP. La résistance de *C. fetus* à la ciprofloxacine augmente en 2018 : proche de 24% versus 20% en 2017.

La résistance à l'érythromycine reste à un niveau inférieur à 1% pour *C. jejuni*, *C. coli* étant comme par le passé plus résistant mais en 2018 comme en 2017 à un niveau inférieur à 10%. Les souches de *C. coli* du réseau Campy.HOP sont plus résistantes que celles du réseau Campy.COM.

La résistance à la tétracycline reste à un niveau très élevé notamment pour *C. coli* et semble stagner pour *C. jejuni*.

La résistance à la gentamicine reste anecdotique pour *Campylobacter sp* mais peut être rencontrée dans les 2 espèces majoritaires en France.

-Tendances évolutives sur une période de 32 ans (Figure 6)

La résistance de *C. coli* à la ciprofloxacine semble s'être stabilisée depuis 2009.

La résistance à la tétracycline semble se stabiliser depuis 2012 pour les 2 principales espèces.

La résistance à l'ampicilline s'est stabilisée depuis 2009.

Aucune évolution notable n'est identifiable pour la résistance à l'érythromycine qui reste sous les 10% pour *C. coli* depuis 2015.

Tableau 3. Résistance à l'ampicilline chez *Campylobacter sp* et *Arcobacter sp*

Ampicilline											
C.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>		Total
Sensible	3139	558	29	9	3	21	5	4	2		3770
Intermédiaire	184	24	0	1	0	4	1	0	0		214
Résistant	1723	226	1	3	1	48	5	1	2		2010
Non renseigné	6	0	0	0	0	0	0	0	0		6
TOTAL	5052	808	30	13	4	73	11	5	4		6000
Résistance en %	34,1	28,0	3,3	23,1	25,0	65,8	45,5	20,0	50,0		
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>		<i>Campylobacter sp</i>		<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	831	141	58	2	5	6		11		2	1056
Intermédiaire	32	7	1	1	0	0		0		0	41
Résistant	482	78	0	4	1	12		0		0	577
Non testé	4	2	0	0	0	1		0		0	7
TOTAL	1349	228	59	7	6	19		11		2	1681
Résistance en %	35,8	34,5	0,0	57,1	16,7	66,7		0,0		0,0	
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>	<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	3970	699	87	11	8	27	5	15	2	2	4826
Intermédiaire	216	31	1	2	0	4	1	0	0	0	255
Résistant	2205	304	1	7	2	60	5	1	2	0	2587
Non renseigné	10	2	0	0	0	1	0	0	0	0	13
TOTAL	6401	1036	89	20	10	92	11	16	4	2	7681
Résistance en %	34,5	29,4	1,1	35,0	20,0	65,9	45,5	6,3	50,0	0,0	

Tableau 4. Résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique chez *Campylobacter sp* et *Arcobacter sp*

Amoxicilline-clav.											
Campy.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>		Total
Sensible	5029	802	30	13	4	45	11	5	4		5943
Intermédiaire	7	4	0	0	0	3	0	0	0		14
Résistant	8	2	0	0	0	25	0	0	0		35
Non renseigné	8	0	0	0	0	0	0	0	0		8
TOTAL	5052	808	30	13	4	73	11	5	4		6000
Résistance en %	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	34,2	0,0	0,0	0,0		
Campy.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>		<i>Campylobacter sp</i>		<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	1337	225	59	7	6	9		11		2	1656
Intermédiaire	0	0	0	0	0	0		0		0	0
Résistant	8	2	0	0	0	9		0		0	19
Non renseigné	4	1	0	0	0	1		0		0	6
TOTAL	1349	228	59	7	6	19		11		2	1681
Résistance en %	0,6	0,9	0,0	0,0	0,0	50,0		0,0		0,0	
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>	<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	6366	1027	89	20	10	54	11	16	4	2	7599
Intermédiaire	7	4	0	0	0	3	0	0	0	0	14
Résistant	16	4	0	0	0	34	0	0	0	0	54
Non renseigné	12	1	0	0	0	1	0	0	0	0	14
TOTAL	6401	1036	89	20	10	92	11	16	4	2	7681
Résistance en %	0,3	0,4	0,0	0,0	0,0	37,4	0,0	0,0	0,0	0,0	

Tableau 5. Résistance à la ciprofloxacine chez *Campylobacter sp* et *Arcobacter sp*

Ciprofloxacine											
Campy.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>		Total
Sensible	2296	258	23	7	3	58	4	2	1		2652
Résistant	2749	550	7	6	1	14	7	3	3		3340
Non testé	7	0	0	0	0	1	0	0	0		8
TOTAL	5052	808	30	13	4	73	11	5	4		6000
Résistance en %	54,5	68,1	23,3	46,2	25,0	19,4	63,6	60,0	75,0		
Campy.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>		<i>Campylobacter sp</i>		<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	593	69	45	3	4	11		8		0	733
Résistant	752	157	14	4	2	7		3		1	940
Non testé	4	2	0	0	0	1		0		1	8
TOTAL	1349	228	59	7	6	19		11		2	1681
Résistance en %	55,9	69,5	23,7	57,1	33,3	38,9		27,3		100,0	
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>	<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	2889	327	68	10	7	69	4	10	1	0	3385
Résistant	3501	707	21	10	3	21	7	6	3	1	4280
Non testé	11	2	0	0	0	2	0	0	0	1	16
TOTAL	6401	1036	89	20	10	92	11	16	4	2	7681
Résistance en %	54,8	68,4	23,6	50,0	30,0	23,3	63,6	37,5	75,0	100,0	

Tableau 6. Résistance à l'érythromycine chez *Campylobacter sp*

Erythromycine											
Campy.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>	Total	
Sensible	5026	749	28	13	2	0	0	3	0	5821	
Résistant	21	59	1	0	2	0	0	2	0	85	
Non renseigné	5	0	1	0	0	73	11	0	4	94	
TOTAL	5052	808	30	13	4	73	11	5	4	6000	
Résistance en %	0,4	7,3	3,4	0,0	50,0	non testé	non testé	40,0	non testé		
Campy.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>		<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. cinaedi</i>	Total	
Sensible	1331	197	59	7	6	0		8	0	1608	
Résistant	14	29	0	0	0	0		3	0	46	
Non renseigné	4	2	0	0	0	19		0	2	27	
TOTAL	1349	228	59	7	6	19		11	2	1681	
Résistance en %	1,0	12,8	0,0	0,0	0,0	Non testé		27,3	Non testé		
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>	<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	6357	946	87	20	8	0	0	11	0	0	7429
Résistant	35	88	1	0	2	0	0	5	0	0	131
Non renseigné	9	2	1	0	0	92	11	0	4	2	121
TOTAL	6401	1036	89	20	10	92	11	16	4	2	7681
Résistance en %	0,5	8,5	1,1	0,0	20,0	non testé	non testé	31,3	non testé	non testé	

Tableau 7. Résistance à la tétracycline chez *Campylobacter sp*

Tétracycline											
Campy.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>	Total	
Sensible	2789	164	25	13	3	0	0	3	0	2997	
Résistant	2249	643	5	0	1	0	0	2	0	2900	
Non renseigné	14	1	0	0	0	73	11	0	4	103	
TOTAL	5052	808	30	13	4	73	11	5	4	6000	
Résistance en %	44,6	79,7	16,7	0,0	25,0	non testé	non testé	40,0	Non testé		
Campy.HOP											
Campy.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>		<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. cinaedi</i>	Total	
Sensible	743	37	49	7	6	0		10	0	852	
Résistant	600	189	10	0	0	0		1	0	800	
Non renseigné	6	2	0	0	0	19		0	2	29	
TOTAL	1349	228	59	7	6	19		11	2	1681	
Résistance en %	44,7	83,6	16,9	0,0	0,0	non testé		9,1	non testé		
TOTAL											
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>	<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	3532	201	74	20	9	0	0	13	0	0	3849
Résistant	2849	832	15	0	1	0	0	3	0	0	3700
Non renseigné	20	3	0	0	0	92	11	0	4	2	132
TOTAL	6401	1036	89	20	10	92	11	16	4	2	7681
Résistance en %	44,6	80,5	16,9	0,0	10,0	non testé	non testé	18,8	non testé	non testé	

Tableau 8. Résistance à la gentamicine chez *Campylobacter sp* et *Arcobacter sp*

Gentamicine											
Campy.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>		Total
Sensible	4417	723	30	13	4	64	11	5	4		5271
Résistant	14	7	0	0	0	1	0	0	0		22
Non renseigné	621	78	0	0	0	8	0	0	0		707
TOTAL	5052	808	30	13	4	73	11	5	4		6000
Résistance en %	0,3	1,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0		
Campy.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>		<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	1338	225	59	6	6	18		11		2	1665
Résistant	7	0	0	1	0	0		0		0	8
Non renseigné	4	3	0		0	1		0		0	8
TOTAL	1349	228	59	7	6	19		11		2	1681
Résistance en %	0,5	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0		0,0		0,0	
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>H. pullorum</i>	<i>H. cinaedi</i>	Total
Sensible	5755	948	89	19	10	82	11	16	4	2	6936
Résistant	21	7	0	1	0	1	0	0	0	0	30
Non renseigné	625	81	0	0	0	9	0	0	0	0	715
TOTAL	6401	1036	89	20	10	92	11	16	4	2	7681
Résistance en %	0,4	0,7	0,0	5,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	

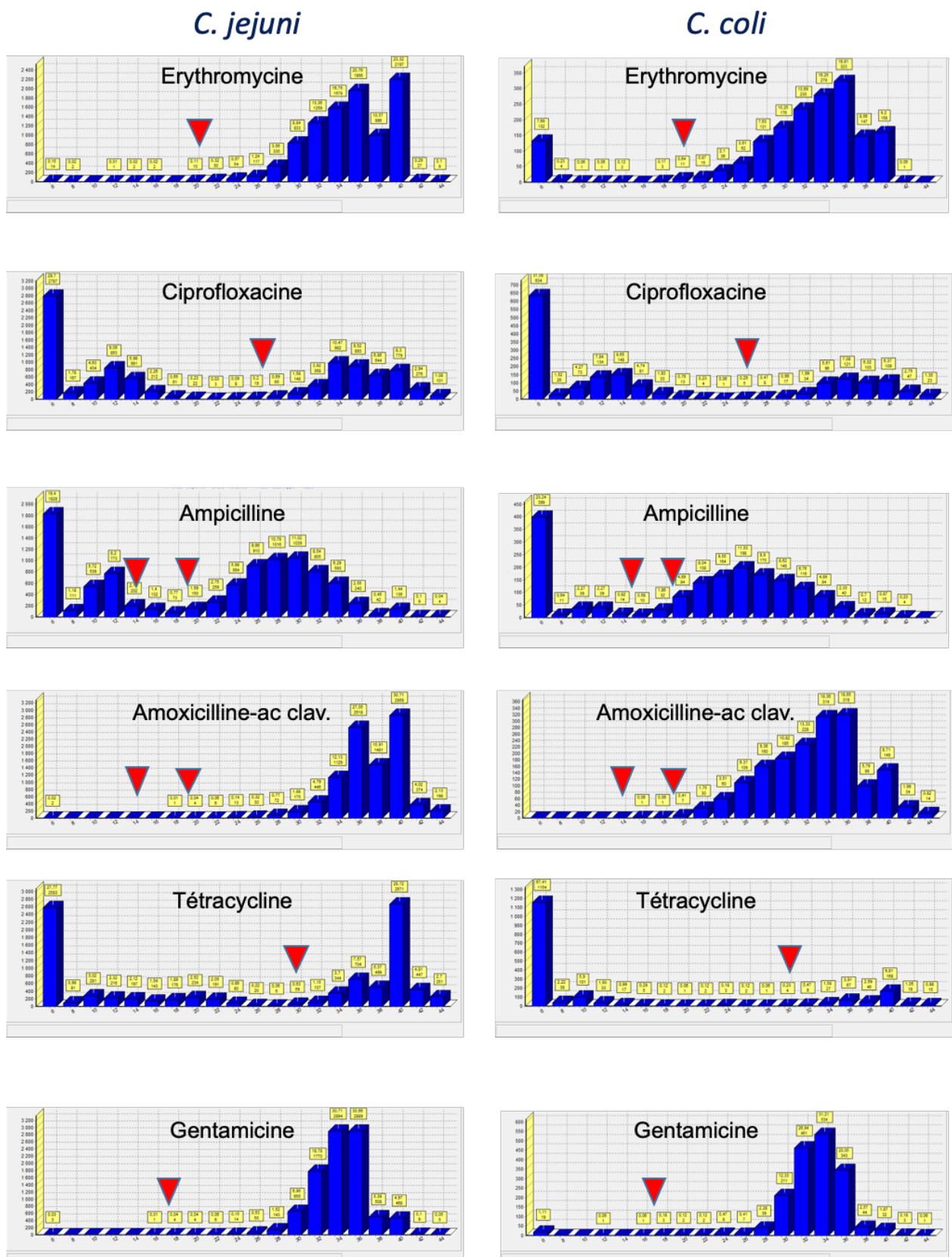
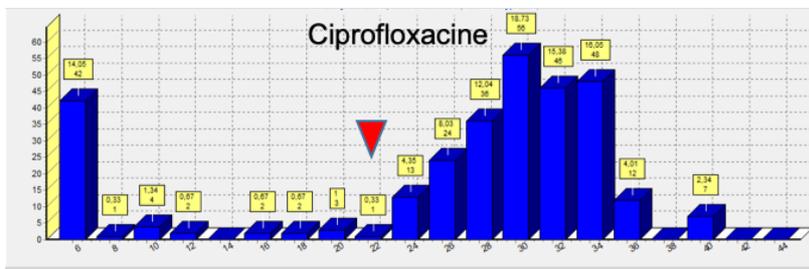
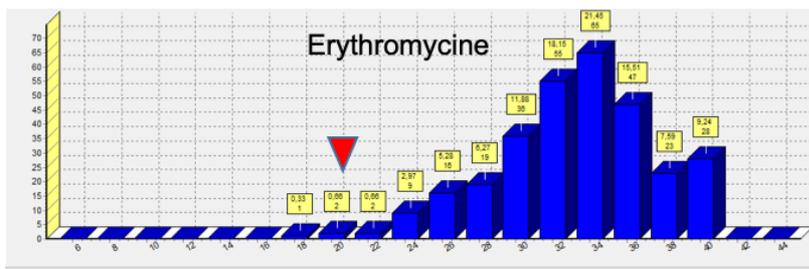


Figure 3. Distribution des diamètres d'inhibition obtenus par la méthode des disques sur une série de 9429 souches de *C. jejuni* et 1717 *C. coli* isolées entre le 01/01/2016 et le 31/12/2018.

La hauteur des histogrammes est proportionnelle au nombre de souches pour chaque diamètre mesuré. La flèche rouge indique le «cut-off» épidémiologique d'interprétation pour chaque molécule selon le CA-SFM 2019. Données issues de la base du SIRWeb.



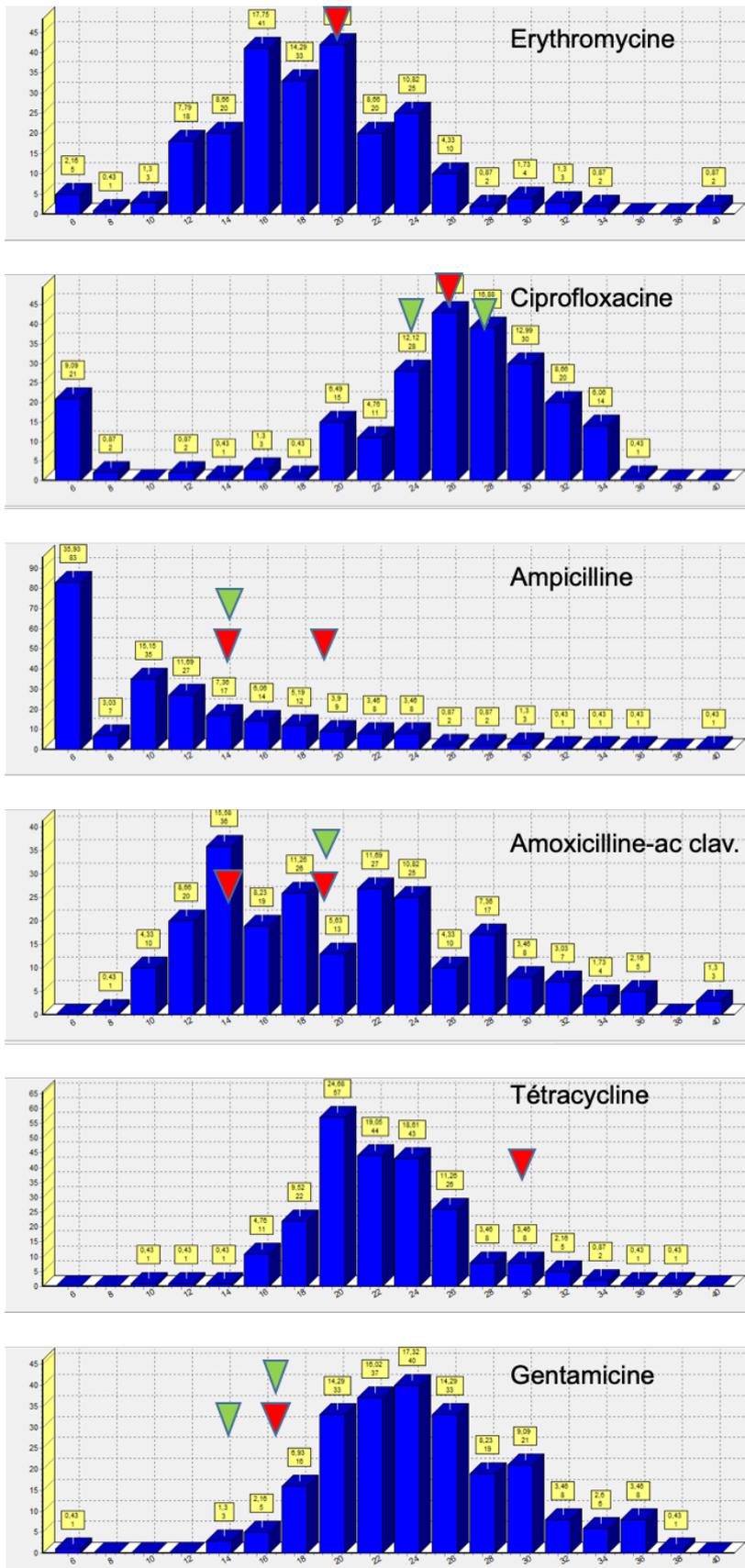


Figure 5. Distribution des diamètres d'inhibition obtenus par la méthode des disques sur une série de 231 souches de *Arcobacter* sp isolées entre le 01/01/2016 et le 31/12/2018.

La hauteur des histogrammes est proportionnelle au nombre de souches pour chaque diamètre mesuré. La flèche rouge indique le «cut-off» épidémiologique d'interprétation pour chaque molécule des *Campylobacters* selon le CA-SFM 2019. La flèche verte indique le «cut-off» épidémiologique d'interprétation pour chaque molécule concernée des Entérobactéries selon le CA-SFM 2019. Données issues de la base du SIRWeb.

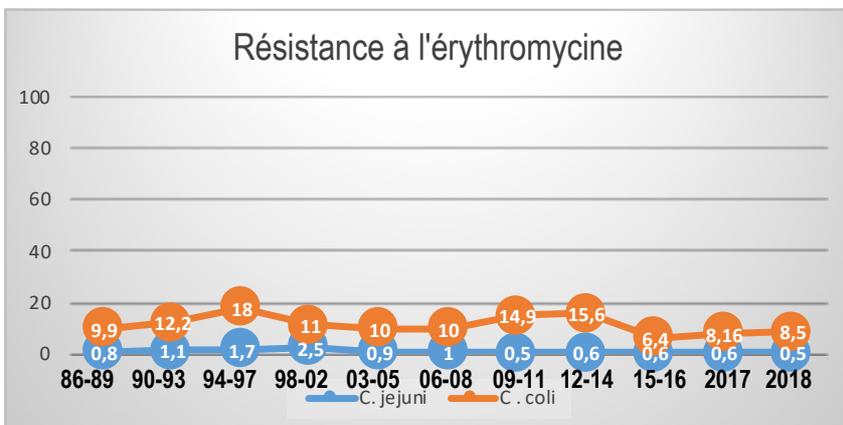
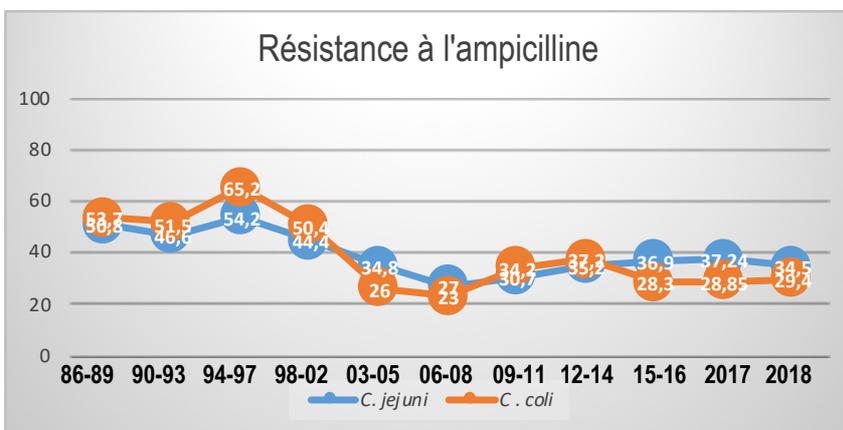
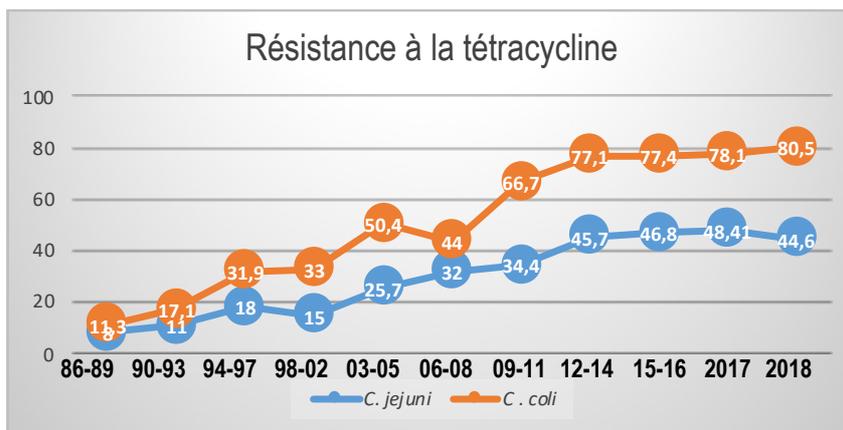
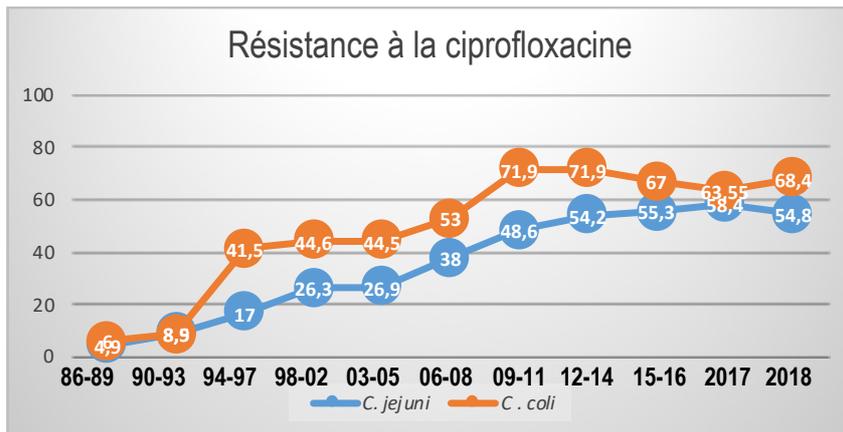


Figure 6 : Evolution de la résistance en France aux antibiotiques chez *C. jejuni* et *C. coli* sur une période de 32 ans. Les résultats sont exprimés en pourcentage.

3.3.2-Surveillance de la résistance de *H. pylori* aux anti-infectieux

Tous les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations du CA-SFM : milieu MH-10% sang de mouton (préparé au CNR), inoculum 3 McF, inondation, incubation à 35°C en atmosphère microaérobie dans une enceinte (Ruskin concept+). La lecture à 48h (ou 72h) est effectuée à l'œil nu par un technicien, puis contrôlée par un biologiste. Les antibiogrammes sont réalisés par la méthode du Etest.

Un CQ est effectué à chaque changement de lot de gélose MH-10%, une trace des valeurs du CQ est stockée dans la base du serveur SIRWeb et dans un classeur d'archivage au CNRCH. Un biologiste vérifie systématiquement les valeurs lues.

La résistance globale de *H. pylori* estimée à partir des antibiogrammes est récapitulée dans le tableau ci-dessous. En 2018, sur les 399 souches de *H. pylori* détectées par culture, une seule n'a pas pu être testée à cause d'une subculture négative.

Molécule	2017 (Nb. et %R)	2018 (Nb. et %R)
Amoxicilline	5/235 (2,1%)	8/398 (2%)
Clarithromycine	96/235 (40,9%)	133/398 (33,4%)
Lévofloxacine	45/235 (19,1%)	76/398 (19,1%)
Métronidazole	159/235 (67,7%)	241/398 (60,6%)
Rifampicine	1/235 (0,4%)	5/398 (1,3%)
Tétracycline	0/235	0/398

Conformément aux années passées, la résistance à l'amoxicilline, rifampicine et tétracycline est rare ou absente chez *H. pylori*.

La résistance à la clarithromycine conditionne soit l'utilisation de cette molécule dans la stratégie thérapeutique soit les chances de succès thérapeutiques en cas de traitement empirique. Le tableau ci-dessous compare les résultats obtenus par Etest et ceux obtenus par PCR de détection des mutations associées à la résistance aux macrolides et ce pour 397 des 398 cultures positives (une souche reçue n'a pas été testée par PCR).

Phénotype clarithromycine	Génotype clarithromycine	2017 Nb. (%)	2018 Nb. (%)
Sensible	WT	135/235 (57,4%)	253/397 (63,7%)
	A2142-43G	0/235 (1,7%)	0/397
	A2142-43G + WT	4/235 (1,7%)	11/397 (2,8%)
	A2142C + WT	0/235	1/397 (0,3%)
Résistant	WT	1/235 (0,4%)	2/397 (0,5%)
	A2142-43G	77/235 (32,8%)	95/397 (23,9%)
	A2142C	3/235 (1,3%)	0/397
	A2142-43G + WT	15/235 (6,4%)	35/397 (8,8%)

Les discordances sont rares entre phénotype et génotype : 0,5% uniquement de discordance majeure due à un cas interprété Résistant *in vitro* mais de génotype WT par PCR. Dans un cas, la CMI lue était à 0,75mg/L (soit une dilution au-dessous du «cut-off» épidémiologique utilisé (0,5 mg/L)), le deuxième cas correspondait à une double population composée d'une souche avec une CMI=0,016 mg/L (WT) et l'autre avec une CMI = 2mg/L (R).

Pour 12 cas, seule la population sensible a été retrouvée sur l'antibiogramme alors que la PCR a détecté la présence d'une double population A2142-43G + WT ou A2142C + WT. Ceci pourrait être interprété comme une discordance

mineure (3,1%).

Dans 35 cas, c'est la population résistante qui a été vue par culture alors que la PCR détectait une double population A2142-43G + WT.

L'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt en routine de coupler culture (avec antibiogramme) et PCR.

La résistance à la clarithromycine déterminée par PCR s'établit comme ceci.

Génotype	Nombre de patients (par génotype) et %
WT	237/397 (59,7%)
A2142-43G	95/397 (23,9%)
A2142C	1/397 (0,2%)
A2142-3G + WT	46/397 (11,6%)
Total Résistants Clarithromycine par PCR	142/397 (35,8%)

Comme par le passé, la mutation A2142-43G est la plus fréquente. La proportion de double population (WT+R) augmente en 2018 *versus* 2017.

De par la diminution importante de l'activité *H. pylori* du CHU (biopsies pour lesquelles nous pouvons récupérer les données cliniques et histologiques) et malgré la mise en place courant 2018 d'une fiche de renseignements pour les correspondants extérieurs au CHU devant accompagner les biopsies gastriques envoyées au CNRCH, le nombre de fiches reçues est faible. Aussi, nous ne donnerons pas pour 2018, d'estimation de la résistance primaire aux antibiotiques pour les souches isolées de biopsies gastriques en routine au CNRCH. Ceci sera présenté ci-après dans ce rapport grâce aux résultats de la troisième phase du protocole PHARE.

Les données présentées ci-après montrent la répartition des CMI pour 983 souches de *H. pylori* et intègrent celles de 2018 (Figure 7). Les « cut-offs » épidémiologiques utilisés pour interpréter les antibiogrammes de *H. pylori* semblent toujours adaptés.

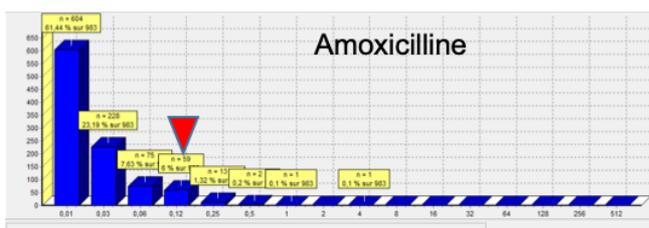
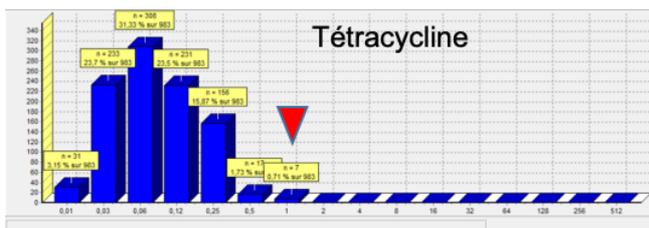
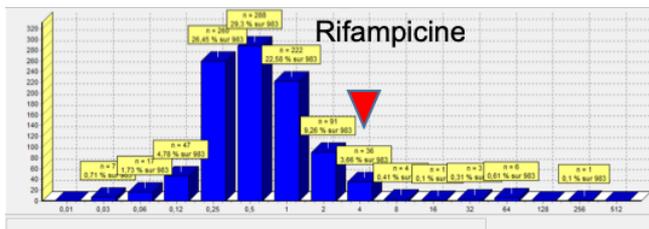
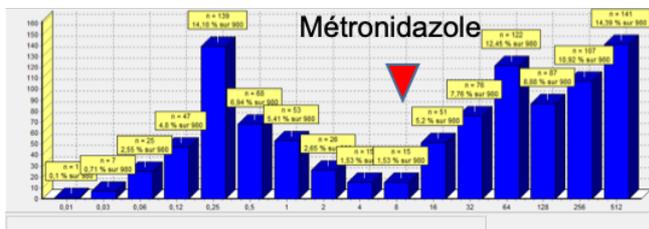
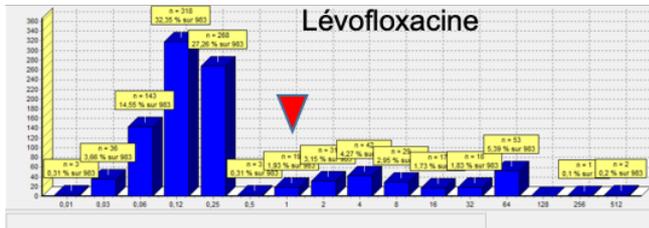
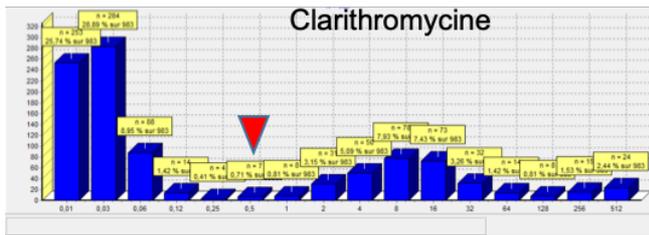


Figure 7. Distribution des CMI obtenues par la méthode du Etest sur une série de 983 souches de *H. pylori* isolées entre le 01/01/2016 et le 31/12/2018.

La hauteur des histogrammes est proportionnelle au nombre de souches pour chaque CMI lue. La flèche rouge indique le «cut-off» épidémiologique d'interprétation pour chaque molécule selon le CA-SFM 2019. Données issues de la base du SIRWeb.

3.4.-Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Nous avons transmis, à la demande de Santé Publique France, nos bilans 2017 et 2018 des réseaux Campy.HOP, Campy.COM et Campy-Internet.

Les résultats de la surveillance ont été transmis par l'intermédiaire de l'ANSP au réseau Européen Enter-net après chaque trimestre.

3.5.-Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

-Etude PHARE.

L'étude PHARE a pour but d'apprécier la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques sur un échantillon représentatif des souches françaises. Elle a été menée en 2014, 2016 et 2018. Nous rapportons ici les résultats préliminaires de 2018.

Soixante-trois gastro-entérologues ont été recrutés au hasard dans les 7 grandes régions de France métropolitaine. Le nombre de cas inclus escompté était de 1000, avec un maximum de 20 cas par médecin.

Finalement, 964 cas ont été inclus durant l'année (Février 2018-Février 2019). La prévalence globale de l'infection a été de 377 cas détectés par PCR (39,1%) pour lesquels la culture a été positive et la sensibilité aux antibiotiques testée par antibiogramme dans 368 cas (9 culture négative : 2,4%).

Les résultats préliminaires ne concernent que les 705 patients qui n'avaient pas reçu de traitement préalable pour éradiquer *H. pylori* dits patients 'naïfs'. Parmi ces cas, 235 (33,3%) étaient *H. pylori* positif par culture et 4 seulement par PCR.

La résistance aux antibiotiques de ces 235 souches est la suivante :

- clarithromycine : 51 (21,7%)
- lévofloxacine : 42 (17,8%)
- métronidazole : 138 (58,7%)

Seulement 1 souche a été trouvée résistante à l'amoxicilline, 2 à la rifampicine et aucune à la tétracycline.

La résistance à la clarithromycine est légèrement supérieure à ce qu'elle était en 2016 (21,7% contre 20,3%) mais inférieure à celle de 2014 (22,2%). Les mutations trouvées sont essentiellement A2142/3G.

La résistance à la lévofloxacine est aussi légèrement supérieure aux années passées (15,4% et 14,7% en 2014 et 2016).

La résistance au métronidazole elle aussi augmente (45,9 et 52,4% en 2014 et 2016).

-Protocole européen de surveillance de la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques.

En 2018, nous avons réalisé une étude Européenne pour connaître la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques, sur le même protocole que celles ayant eu lieu en 1998 et 2008.

Vingt-cinq centres répartis dans 18 pays Européens y ont participé. Un seul centre a été recruté sur une base de volontariat pour les petits pays d'environ 10 millions d'habitants (Autriche, Belgique, Bulgarie, Croatie, Danemark, Grèce, Irlande, Lettonie, Lituanie, Norvège, Pays Bas, Portugal, Slovénie) et plusieurs centres pour les grands pays (Allemagne, Italie, Espagne, Pologne). Le nombre de cas recrutés devait être de 50 par centre. Pour la France les données de l'étude PHARE de 2018 ont été prises en compte.

Nous n'avons à ce jour que des résultats préliminaires correspondant aux souches isolées de 1 382 patients adultes n'ayant jamais reçu de traitement d'éradication.

Les taux de résistance globaux obtenus sont les suivants :

- clarithromycine 27%
- lévofloxacine 17,36%
- métronidazole 42,18%

Par ailleurs, les centres ont répertorié 27 souches résistantes à l'amoxicilline, 5 souches résistantes à la tétracycline et 54 souches résistantes à la rifampicine.

Le résultat de ces dernières souches sera vérifié dans un laboratoire central en utilisant notamment des méthodes moléculaires ainsi que les résultats d'un échantillon de 10% pris au hasard parmi les autres souches.

Globalement depuis 1998, on observe une augmentation proche de 1% par an de la résistance à la clarithromycine en Europe, auquel la France fait exception.

-Collaboration avec le Centre National de Référence des bactéries entériques (Dr Monica Oleastro) du Portugal et le CNR des *Campylobacter* anglais (Dr Gauri Godbole) à la caractérisation des mécanismes de résistance des *Campylobacter* aux carbapénèmes (données du CNR). Cette résistance, sur la base des résultats de sensibilité à l'ertapénème, concerne moins de 3% des *Campylobacter*. Nous avons élucidé les mécanismes de résistance qui sont liés à une imperméabilité due à une insertion dans la porine majeure PorA et des mutations dans le système d'efflux *cmeABC* et son répresseur *cmeR*. Ce travail a été présenté sous forme d'un poster à l'ECCMID 2018 (Madrid). Un article scientifique va être soumis en 2019.

-Détermination de la résistance à l'ertapénème chez *Campylobacter sp.* 315 souches (234 *C. jejuni*, 61 *C. coli* et 11 *C. fetus*) ont été testées par Etest sur gélose MHF selon les recommandations du CASFM-EUCAST. La figure ci-après représente la distribution de CMI pour les 3 espèces (Figure 8).

Sur la base du «cut-off» proposé pour interpréter la sensibilité à l'ertapénème, soit $R > 1$ mg/L, la prévalence de la résistance à l'ertapénème chez *Campylobacter sp* est de 1,9% (6/315). La distribution des CMI montrent un décalage de CMI entre *C. jejuni* et *C. coli* : 5 des 6 souches présentant une CMI >1 mg/L étaient des *C. coli*.

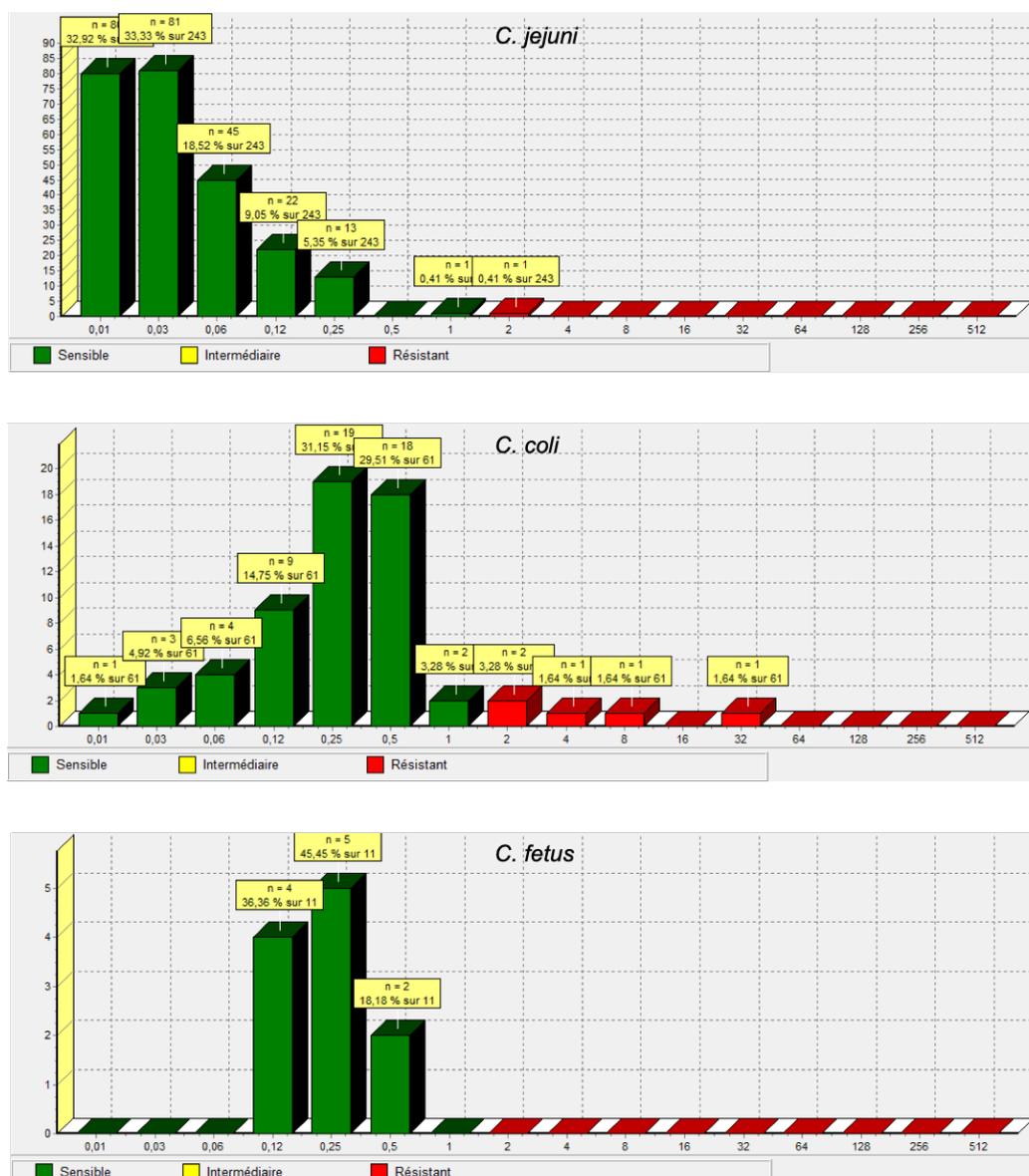


Figure 8. Distribution des CMI ertapénème obtenues par la méthode du Etest sur une série de 315 souches de *Campylobacter sp* (234 *C. jejuni*, 61 *C. coli* et 11 *C. fetus*).

La hauteur des histogrammes est proportionnelle au nombre de souches pour chaque CMI lue. Les barres en vert correspondent aux souches présentant une CMI ≤ 1 mg/L, les barres en rouge celles avec une CMI >1 mg/L. Données issues de la base du SIRWeb.

-Caractérisation des mutations dans l'ADNr16S de *H. pylori* associées à la résistance à la tétracycline.

Le laboratoire de résistance aux antibiotiques de *H. pylori* du CHU NAMUR en Belgique a fait parvenir au CNR 3 souches de *H. pylori* afin de tester et confirmer une résistance à la tétracycline. Ces 3 souches ont été confirmées au CNRCH comme résistantes à la tétracycline par antibiogramme (Etests) : CMI variable allant de 1,5 à 24 mg/L.

La présence de mutation(s) sur le gène codant pour l'ARNr 16S (codon 926-928), responsable d'une résistance à la tétracycline, a été testée par PCR en temps réel format FRET (Glocker E *et al.*, 2005). Les températures de fusion obtenues étant différentes de celles d'une souche sensible, la partie cible du gène a été séquencée. Le séquençage a confirmé que ces 3 souches possèdent bien une ou deux mutations au niveau du codon 926-928 : TGA, GGA et TGC au lieu du codon AGA attendu dans les souches sensibles.

Souche	Culture		Séquençage	PCR en temps réel format FRET*			
	Tétracycline	CMI (mg/L)	16S codon* 926-928	Tm sonde1 obtenue	Tm sonde1 publiée**	Tm sonde2 obtenue	Tm sonde2 publiée**
HP TETRA 02	Résistante	1-1,5	<u>T</u> G <u>A</u>	55,8	non décrit	56,8	non décrit
HP TETRA 03	Résistante	3-6	<u>G</u> G <u>A</u>	57	57,4	55,4	56,5
HP TETRA 06	Résistante	8-24	<u>T</u> G <u>C</u>	48,9	50,5	57,1	59,4

*codon pour une souche Tétrà S = AGA

**Glocker E *et al.*, Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*, Antimicrob Agents Chemother. 2005 Aug;49(8):3166-70.

Les données présentées ci-dessus démontrent qu'une résistance ou une sensibilité réduite à la tétracycline peut être le résultat de mutations simples ou doubles au niveau du gène de l'ARNr 16S de *H. pylori*. Seules les résistances de haut niveau sont dues à une mutation triple.

Ce même type de projet a été conduit avec une collaboratrice au Venezuela :

Nous avons été sollicités par le Dr Monica Contreras (Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Miranda, Venezuela) afin de détecter par PCR en temps réel les mutations du gène codant pour l'ARNr 16S sur des ADN extraits de 96 isolats de *H. pylori* (48 obtenus à partir de l'antré et 48 à partir de l'œsophage) chez 8 patients dyspeptiques.

Contrairement aux résultats *in vitro* obtenus par nos collaborateurs, nous avons détecté qu'une majorité des souches potentiellement sensibles et de rares souches présentant une seule substitution de paires de bases (AGA926-GGA). Ce travail indique que la PCR en temps réel *H. pylori* est une méthode plus fiable pour la catégorisation de la tétracycline pour des microbiologistes ne possédant pas les moyens techniques appropriés pour réaliser des antibiogrammes pour cette bactérie. Un article scientifique est en cours d'écriture et sera soumis avant la fin du mois d'avril 2019.

-Surveillance des mutations présentes dans le gène *rpoB* associées à la résistance aux rifamycines chez *H. pylori*.

En 2018, le gène *rpoB* de 7 souches *H. pylori* isolées au CNRCH ayant une CMI à la rifampicine supérieure à 4mg/L a été séquencé afin de déterminer les mutations responsables de cette résistance.

Souche	CMI Rifampicine (mg/L)	Mutation <i>rpoB</i>
4796	32	D530N
4906	>32	H540C
4908	>32	L547F
5002	>32	D530E+H540L
5057	>32	D530N
p167	>32	double population : pas de mutation + L525I
p595	>32	D530N

Les mutations les plus représentées sont celles présentes au niveau des acides aminés 530 (4 souches) et 540 (2

souches) : substitution d'un D par N ou E pour la position 530 et substitution d'un H par L pour la position 540, à noter une double population avec mutation à la fois en 530 et en 540. Une seule souche possède la mutation L547F. Une autre double population a été détectée par séquençage, avec une population sensible et résistante. La mutation de la population résistante est L525I.

Ces mutations sont connues et décrites (Mutations at four distinct regions of the *rpoB* gene can reduce the susceptibility of *Helicobacter pylori* to rifamycins. Heep M, Odenbreit S, Beck D, Decker J, Prohaska E, Rieger U, Lehn N. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jun;44(6):1713-5).

-Evaluation des mutations associées à la résistance à l'amoxicilline chez *H. pylori*.

En 2018, trois souches de *H. pylori* présentaient une CMI à l'amoxicilline supérieure à 0,125 mg/L, c'est-à-dire catégorisées résistantes : 0,19 mg/L (n=2) et 6 mg/L (n=1). Une souche dont la CMI était de 0,125 mg/L a également été étudiée.

Le gène *pbp1*, codant pour la « penicillin-binding protein », est connu pour être responsable de la résistance à l'amoxicilline, mais les mutations en cause sont nombreuses et mal déterminées. Les mutations présentes dans le gène *pbp1* de ces 4 souches ont donc été recherchées afin de vérifier le statut résistant et de faire un état des lieux des mutations.

La mutation N562Y a été retrouvée chez les 3 souches amoxicilline-R. Elle a déjà été décrite dans la littérature (Rimbara *et al.*, Correlation between Substitutions in Penicillin-Binding Protein 1 and Amoxicillin Resistance in *Helicobacter pylori*, Microbiol. Immunol., 2007).

D'autres mutations décrites ont également été retrouvées, mais non représentées chez toutes les souches amoxicilline-R :

- la mutation S414R et l'insertion de l'acide aminé G en 595 ont été retrouvées uniquement chez la souche avec une CMI à 6mg/L ;
- la mutation S543R n'a été retrouvée que chez une des 2 souches avec CMI à 0,19 mg/L ;
- la mutation G595S a été retrouvée uniquement chez la deuxième souche avec une CMI à 0,19 mg/L ;
- la mutation T593A a été retrouvée chez la souche dont la CMI est égale à 0,125 mg/L ;
- la mutation T593S a été retrouvée chez une des souches dont la CMI est égale à 0,19 mg/L ;

Des mutations non décrites ont été retrouvées uniquement chez la souche avec une CMI à 6mg/L :

- l'insertion des deux acides aminés KD en 465 ;
- la mutation T355A.

Une seule mutation non décrite a été retrouvée chez l'une des souches avec une CMI à 0,19 mg/L :

- la mutation V469M.

Selon ces tests, la mutation N562Y semble être la plus discriminante pour identifier une résistance à l'amoxicilline (souche avec CMI>0,125 mg/L) chez *H. pylori*.

Les niveaux de CMI semblent être influencés par le nombre de mutations retrouvées au sein de *pbp1*.

Ces résultats sont à approfondir dans les années à venir pour d'autres souches amoxicilline-R.

-Collaboration avec l'institut Pasteur en Uruguay, Montevideo (Dr Gabriel Iraola Bentacor) sur l'étude du pouvoir pathogène de la bactérie *Sutterella wadsworthensis*.

Trente souches isolées de coprocultures de patients du CHU de Bordeaux ont été envoyées pour séquençage. L'analyse phylogénétique du core génome montre la présence de 3 « clusters » majoritaires. L'étude du contenu génétique n'a identifié aucun gène de virulence (PATRIC VF Database) ou gène de résistance aux antibiotiques d'intérêt (ResFinder). Des cocultures réalisées entre 11 souches de *S. wadsworthensis* représentatives de chacun des 3 clusters identifiés, sur une lignée épithéliale intestinale humaine (lignée HT-29) n'a pas permis d'identifier de pouvoir proinflammatoire pour cette bactérie. Les données de métagénomique indiquent également que la population humaine peut être porteuse de manière asymptomatique (et ce pour les 3 clusters) de cette bactérie au niveau du tube digestif. Ces résultats démontrent donc que *S. wadsworthensis* n'est pas un pathogène entérique et répondent ainsi aux interrogations des cliniciens à ce sujet. Un article est en révision dans Communications Biology.

-Collaboration avec IFREMER pour la caractérisation d'une nouvelle espèce du genre *Campylobacter* : *Campylobacter armoricus*.

Au cours d'une étude sur la prévalence et la diversité de *Campylobacter spp.* dans une zone de cueillette de mollusques et d'élevage en Bretagne, neuf isolats de *Campylobacter* uréase positifs ont été identifiés comme appartenant au groupe *Campylobacter lari* par MALDI-TOF mais inclus dans un groupe distinct du genre *Campylobacter sp* de par la séquence du gène *aptA* déterminée après séquençage du génome entier. Cette position phylogénétique a été confirmée par l'analyse de la phylogénie des loci *ARNr 16S*, *rpoB* et *hsp60*. L'identité moyenne

des nucléotides entre la souche représentative CA656T et la souche type du taxon le plus étroitement apparenté, *C. ornithocola* WBE38T et *C. lari* Slaughter Beach, était de 88,6%. Ces résultats suggèrent que les 9 isolats correspondent bien à une nouvelle espèce du genre *Campylobacter*.

Les souches de cette nouvelle espèce sont de forme spiralee, à Gram négatif, strictement anaérobies, non motiles, ne forment pas de spores, et présentent des activités de catalase, d'oxydase et d'uréase, mais pas de réduction des nitrates.

Le CNRCH a participé à la caractérisation (biochimique, phénotypique, MALDI-TOF, microscopie électronique) de cette nouvelle espèce et à la description de la séquence complète de son génome et de son annotation. Celui-ci fait 1 588 860 pb, a une teneur en G+C de 28,5% et code pour 1588 gènes, dont 38 sont des ARNt. Sur la base des caractéristiques rapportées ici, nous proposons la création d'une nouvelle espèce bactérienne, *Campylobacter armoricus* sp. nov., et la souche CA656T comme souche type.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec :

¹ Ifremer, RBE-SG2M-LSEM, Laboratoire Santé Environnement Microbiologie, Plouzané, France ;

² Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Environmental Research and Innovation Department, Esch-sur-Alzette, Luxembourg ;

³ US Department of Agriculture, Produce Safety and Microbiology Research Unit, Agricultural Research Service, Albany, California, USA ;

⁴ Laboratoire de Médecine Vétérinaire (LMVE), Veterinary Services Administration, Dudelange, Luxembourg ;

⁵ Laboratoire National de Santé (LNS), Epidemiology and Microbial Genomics Unit, Dudelange, Luxembourg.

Un article scientifique sera soumis au cours du premier semestre 2019.

Nous avons intégré les profils protéiques de cette nouvelle espèce dans notre base MALDI-TOF (Bruker) ce qui nous permet d'identifier dorénavant cette nouvelle espèce sans confusion avec *C. lari* ou *C. ornithocola*.

-Évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* de produits d'origine naturelle sur *C. jejuni*, *C. coli* et *H. pylori* :

Projet avec le laboratoire Solstarpharma

Dans ce projet le laboratoire Solstarpharma (<https://www.solstarpharma.com/>) nous a proposé de tester une molécule naturelle nommée artémisinine encapsulée dans de l'amidon pour la rendre soluble, en parallèle à un extrait naturel de plante nommé NACINN sur *Campylobacter* sp et *H. pylori*.

L'artémisinine est actuellement largement utilisée dans le monde comme l'un des médicaments les plus utilisés contre le paludisme. Les grandes études cliniques et les méta-analyses n'ont montré aucun effet secondaire grave chez l'homme. Des recherches ont montré que, dans le passé, des thés médicinaux chinois contenant de l'artémisinine naturelle d'origine végétale étaient utilisés pour traiter diverses infections (par exemple comme antiparasitaires). Le composé NACINN est extrait de cannelle, il est approuvé par la FDA.

L'activité antibactérienne de ces composés a été évaluée *in vitro* (tests en disque et CMI par dilution en milieu gélosé) sur 30 souches de *C. jejuni*, 10 souches de *C. coli* et 40 souches de *H. pylori*.

Une activité antimicrobienne a été retrouvée *in vitro* pour les 2 composés.

Les combinaisons amoxicilline-artémisinine sont indifférentes *in vitro*. Un effet additif est obtenu entre clarithromycine et artémisinine *in vitro* seulement pour les souches sensibles.

Des tests *in vivo* complémentaires pour *H. pylori* sont en cours depuis février 2019.

Projet avec le laboratoire Neteos

Le laboratoire Neteos possède une expertise dans le domaine des huiles essentielles, des terpénoïdes, des phénylpropanoïdes et de leurs dérivés (ou analogues) de leur formulation et de leurs applications en microbiologie. La société possède un savoir-faire et une expertise en matière d'expérimentation microbiologique *in vitro* et *in vivo* sur les composés cités ainsi que d'une façon générale sur les composés hydrophobes. La Société a développé et breveté un portefeuille de technologie en médecine humaine avec une nouvelle classe d'antibiotiques et de potentialisateur d'antibiotiques.

Le CNRCH a commencé à tester en 2018 l'efficacité d'un composé dénommé CIN pour éradiquer *H. pylori* dans un modèle animal de souris C57 BL/6 infectées par *H. pylori*, utilisé seul ou en association avec l'amoxicilline et/ou un inhibiteur de l'acidité gastrique. Le principe de cette étude est donc d'infecter des souris puis de les traiter par gavage avec le ou les produits susnommés afin de déterminer *in vivo* leurs activités anti- *H. pylori*.

Compte tenu de l'absence totale de données *in vivo*, nous envisageons au maximum 4 expériences successives chacune utilisant 60 souris, pour obtenir des données statistiquement exploitables.

Les tests préliminaires sont encourageants avec une réduction significative de l'inoculum bactérien par comparaison aux souris infectées non traitées.

Des tests *in vivo* complémentaires pour *H. pylori* sont également en cours depuis février 2019.

-Collaboration avec l'Institute of Medical Microbiology, University of Zurich (Dr K Wagner), afin d'évaluer les performances d'une stratégie NGS comparée aux techniques phénotypiques pour la détection de marqueurs moléculaires associés à la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques.

La détermination de la sensibilité de *H. pylori* aux antibiotiques repose encore principalement sur la culture et des tests de sensibilité *in vitro* longs et parfois laborieux. Le séquençage du génome entier (WGS) est récemment apparu comme un outil de diagnostic permettant de prédire de manière fiable la pharmacorésistance des bactéries pathogènes.

Le but de cette étude était de comparer les résultats phénotypiques avec les prédictions basées sur la présence de déterminants génétiques identifiés dans le génome de *H. pylori* à l'aide du WGS.

La résistance phénotypique à la clarithromycine, au métronidazole, à la tétracycline, à la lévofloxacine et à la rifampicine a été déterminée sur 140 isolats cliniques de *H. pylori* par Etest, et la présence de certains polymorphismes (SNP) dans les gènes cibles a été déterminée par WGS.

Dans l'ensemble, il y avait une forte concordance (> 99%) entre les résultats pour la clarithromycine, la lévofloxacine, la rifampicine et les SNP identifiés dans les gènes 23S *rRNA*, *gyrA* et *rpoB*. Cependant, il n'a pas été possible de corrélérer une résistance phénotypique pour le métronidazole à la présence de SNP dans les gènes *frxA* et *rdxA*.

Les 140 isolats de *H. pylori* analysés dans cette étude étaient sensibles *in vitro* à la tétracycline et ne présentaient pas de substitutions doubles ou triples des nucléotides cibles dans le gène de l'ARNr 16S.

Le CNRCH est intervenu dans l'interprétation des résultats et a participé à vérifier *in vitro* certaines discordances phénotypes/génotypes initialement signalées par nos collaborateurs.

Ce travail a été publié en janvier 2019 dans J Clin Med.

-Bilan d'un essai de spectrométrie IR pour *H. pylori*, en partenariat avec Bruker.

L'IR Biotyper est une nouvelle plateforme proposée par la société Bruker (Bruker Daltonics) pour le typage bactérien. Son principe repose sur la mesure de l'absorbance de la matière étudiée suite à son excitation par une source Infra-Rouge. L'analyse des spectres permet d'étudier la composition en biomolécules de la matière. La zone de discrimination la plus élevée pour l'application microbienne est celle des polysaccharides, située dans une longueur d'ondes de 1300 à 800 cm^{-1} . Cet instrument fait actuellement l'objet d'études afin de connaître son pouvoir de discrimination et son apport dans l'investigation de cas épidémiques, de clonalité. A ce titre, le CNRCH a, en partenariat avec Bruker, testé 14 souches de *H. pylori* d'origines géographiques différentes afin de définir si l'IR Biotyper pouvait, comme la MLST, les grouper en « clone » en fonction des origines géographiques déterminées par MLST (4 souches asiatiques, 4 souches africaines, 6 souches européennes). A l'issue de l'expérience, les différentes souches n'apparaisaient pas groupées en fonction de leur origine géographique. Le spectromètre IR Biotyper ne semble donc pas pouvoir discriminer les souches en fonction de leur origine géographique.

4-Alerte

Comme indiqué précédemment, les cas groupés sont rares pour les infections à *Campylobacters*. Nous signalons par email tout événement à notre correspondant Santé Publique France.

Notre système de saisie Campy-Internet et les requêtes réalisées sur le système informatique du laboratoire, nous permettent à la demande de vérifier tout phénomène inhabituel qui serait transmis immédiatement à Santé Publique France. Ces tâches sont depuis janvier 2018 dévolues au secrétariat du CNR.

Aucun événement majeur n'a été noté en 2018.

5-Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1.-Conseil et expertise aux professionnels de santé

-Liste des enseignements et des formations aux professionnels de santé

	P Lehours	F Mégraud	E Bessède
Journée scientifique des correspondants du CNRCH (septembre 2018)	Organisation-Intervenant	Intervenant	Intervenant
DIU de maladies infectieuses : cours sur les infections à Campylobacters et cours sur <i>H. pylori</i> (janvier 2019)	Intervenant	-	-

-Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques

- Bujana ALLUSHI – Albanaise étudiante en Pologne – 1 mois : apprentissage de la PCR et de la culture de *H. pylori*.
- Nina LOPEZ-LOZANO – Licence 3, Université de Bordeaux – 1 mois : création de spectres de référence au MALDI-TOF de *C. lari/C. ornithocola/C. armoricus*.
- Abir KOUIDRA - pharmacienne CHU Mustapha, Alger - 2 mois : apprentissage de la PCR et de la culture de *H. pylori* et des Campylobacters.
- René DEMBELE – microbiologiste, Université de Dédougou, Burkina Faso -1 mois : apprentissage de la PCR et de la culture des Campylobacters.

-Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Les biologistes du CNRCH ont rédigé deux chapitres l'un sur Campylobacter, l'autre *Helicobacter pylori* pour l'édition 2018 du référentiel de Microbiologie clinique (REMIC 6.1).

-Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR

La diffusion des activités du CNR se fait non seulement par notre participation active aux congrès de microbiologie (spécialisés ou généralistes) et de gastroentérologie mais également via notre site internet (www.cnrch.fr). Le rapport annuel du CNR est disponible. Les modifications de la feuille de demande sont annoncées, la feuille est téléchargeable. Un extrait des recommandations du CA-SFM est accessible. La liste des publications les plus récentes est affichée également.

-Rétro-information aux partenaires

Chaque partenaire nous ayant informé ou sollicité pour une problématique apportant une lumière nouvelle sur le traitement ou le diagnostic des infections liées à notre CNR est remercié ou bien associé aux communications et publications (congrès ou articles).

Une journée des « correspondants » du CNR a été organisée en septembre 2018. Ceci sera reconduit chaque année (cf projet 2019).

-Information/formation des professionnels de santé

Comme précédemment évoqué, notre site internet (www.cnrch.fr) est mis à jour le plus régulièrement possible. Une annexe décrivant les modalités d'accès et de fréquentation de notre site est intégrée à la fin de ce rapport.

-Les principales mises à jour du site internet en 2018 sont listées ci-dessous

-Création d'un onglet « Fiches techniques et fiches de renseignements ».

Helicobacter pylori :

- ✓ Conditions d'envoi des biopsies gastriques.
- ✓ Fiche de renseignements patients.
- ✓ Fiche technique : comment cultiver *H. pylori* à partir d'une biopsie gastrique.

Campylobacter :

- ✓ Mise en ligne des fiches de renseignements patients actualisées.
- ✓ Mise en ligne des conditions et méthode de transport des souches.

-Mise à jour du fil Actualités.

- ✓ Mise en ligne des publications scientifiques du CNRCH.
- ✓ Mise en ligne des documents techniques.
- ✓ Mise en ligne des articles de presse liés aux Helicobacters et Campylobacters.
- ✓ Mise en ligne de photographies au microscope de Helicobacters.

-Mise à jour des paramètres de saisies sur campynet.fr et intégration des nouveaux adhérents : création des accès réservés, diffusions, suivis.

-Modification des paramètres de saisie en ligne des dossiers patients pour nos correspondants via le site www.cnrch.fr. Cela implique dorénavant la saisie complète des renseignements avec « champs obligatoires ».

-Mise en ligne de « recommandations » émanant de comités scientifiques ou du CNRCH.

-Mise à jour des collaborations locales, nationales et internationales du CNRCH.

-Evolution du système de transport Chronopost des souches à destination du CNRCH :

Un URL, lien internet sur l'application Chronopost, pour la création des bordereaux de retour de nos correspondants, a été modifié et transmis à l'ensemble des correspondants. Le service dit « Enlèvement sur Demande », via l'URL, permet dorénavant à nos correspondants de programmer directement leur collecte sans passer par le service commercial. Une note explicative a été diffusée à l'ensemble des correspondants. L'ensemble est renseigné sur le site www.cnrch.fr dans l'onglet dédié. Une enquête ponctuelle auprès de nos correspondants nous a indiqué une meilleure fluidité et un gain de temps certain pour eux et également pour le CNRCH.

-Activités de conseil aux professionnels de santé

Des appels téléphoniques ainsi que des courriels nous arrivent régulièrement, principalement pour des conseils thérapeutiques en cas d'infection systémique et de situations particulières. Une réponse est systématiquement donnée.

Un bilan 2018 des mails et appels téléphoniques a été réalisé par le secrétariat du CNR grâce au travail du secrétaire recruté début 2018. Les données sont présentées ci-dessous.

Nb. et nature des contacts	Modalités	Détails
102 contacts pour des conseils thérapeutiques	contacts téléphoniques (n=57)	71 pour <i>H. pylori</i> 24 pour <i>Campylobacter sp</i> 7 pour <i>Arcobacter sp</i>
	contacts email (n=45)	
69 contacts pour des conseils techniques	contacts téléphoniques (n=21)	dont 22 pour des problèmes de CQ pour <i>C. jejuni</i>
	contacts email (n=48)	

Les emails sont adressés soit directement aux biologistes du CNR soit via le système messagerie intégrée au site internet. Dans ce dernier cas, les biologistes du CNR (P Lehours, F Mégraud, E Bessède) ainsi que le secrétariat du CNR sont tous destinataires. P Lehours répond en priorité et en cas d'absence les directeurs adjoints répondent. Nous répondons à nos messages en général en moins de 24h ouvrées.

Si une problématique nécessite discussions ou consensus entre les biologistes, elle peut être abordée en petit comité ou bien lors de la réunion du CNR.

Depuis janvier 2018, le secrétariat du CNR centralise toutes les réponses et s'assure que toutes les questions ont été résolues.

Les appels téléphoniques sont transmis immédiatement à un des biologistes du CNR, en cas d'absence l'appel est noté dans un classeur spécifique et un mail est envoyé par notre personnel aux biologistes pour les prévenir.

Un planning de présence des biologistes est affiché et actualisé mensuellement au niveau du secrétariat du CNR.

5.2.-Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- Sollicitation par le CA-SFM pour proposer des valeurs d'interprétation en diamètres et/ou CMI pour l'interprétation des bactéries du genre *Campylobacter* (et apparentées) et *H. pylori*.
- Transmission à l'ECDC via Santé Publique France des résistances aux antibiotiques chez les *Campylobacters*.

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

Aucun élément à répertorier.

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 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

1-Bilan pour les souches de *C. jejuni* :

C. jejuni est la cause la plus courante de gastro-entérite bactérienne dans le monde. Principalement isolé des échantillons de selles, *C. jejuni* peut devenir invasif et se retrouver dans le sang d'individus infectés. *C. jejuni* appartient au microbiote commensal d'un certain nombre d'hôtes notamment animaux et l'infection par cette bactérie peut parfois être attribuée à l'exposition à un réservoir spécifique.

En 2018, nous avons séquencé 198 isolats cliniques (2010-2016) et les avons comparés à 701 génomes de *C. jejuni* humains, de poulets, de ruminants et de l'environnement disponibles dans la base BIGSdb (<http://bigsdbs.readthedocs.io/en/latest/>) afin d'examiner la contribution relative de différents réservoirs à une infection non invasive et invasive en France.

Année	<i>C. jejuni</i> invasifs	<i>C. jejuni</i> non invasifs
2009	-	39 ^a
2011	17 ^b	-
2012	18 ^b	-
2013	33 ^b	-
2014	35 ^b	-
2015	1 ^a + 32 ^b	78 ^a
2016	37 ^b	26 ^b
Total	173	143

^a génomes publiés par Thépault A *et al.*, Sci Rep 2015 ; ^b génomes séquencés dans cette étude.

Des marqueurs génétiques pouvant discriminer la source de *C. jejuni* identifiés par nos collaborateurs au LNR Ploufragan et à l'Université de Bath (UK) ont été utilisés avec le logiciel STRUCTURE (<https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>) pour attribuer de manière probabiliste la source des souches cliniques. Une étape de correction de l'auto-attribution, basée sur la précision de la répartition de la source dans chaque réservoir potentiel, a permis d'améliorer la précision de l'attribution des souches cliniques. Nos résultats démontrent un rôle important des réservoirs de ruminants en France dans les infections non invasives à *C. jejuni* et une contribution potentiellement accrue du poulet en tant que source d'infections invasives (Figure 9).

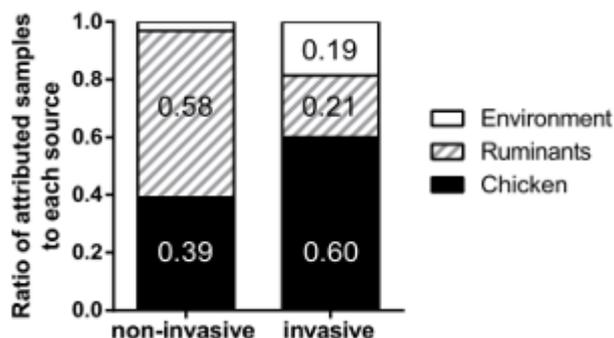


Figure 9 : Proportion de souches invasives ou non invasives de *C. jejuni* au sein de 3 réservoirs potentiels. Attribution d'isolats cliniques français (n = 104) et invasifs (n = 105), collectés entre 2014 et 2016, à des isolats provenant de la volaille, des ruminants et de l'environnement (respectivement 352, 136 et 95 isolats). Les tests d'attribution ont été réalisés à l'aide du logiciel STRUCTURE avec 10 réplicats. La proportion corrigée d'isolats attribuée à chaque réservoir est représentée après l'étape de correction du modèle en fonction des résultats d'auto-attribution observés pour chaque test d'attribution.

Nous mettons également en évidence une variation de la contribution de différentes sources d'infection au fil du temps. Ceci fournit une base pour la surveillance continue de l'épidémiologie génomique des infections à *C. jejuni* et les interventions ciblées dans les réservoirs potentiellement incriminés.

Ce travail a été soumis pour publication dans Sci Rep en décembre 2018.

2-Bilan des séquençages de génomes de *A. butzleri* :

A. butzleri représente moins de 3,3% des cas d'infection entérique bactérienne répertoriée dans nos données 2018 et correspond à la 3^{ème} espèce la plus fréquemment isolée de selles. Nous avons choisi d'appliquer une stratégie NGS afin d'identifier les marqueurs génétiques de résistance pour nous aider à déterminer des « cut-offs » épidémiologiques adaptés à cette bactérie. 30 souches ont été sélectionnées pour le WGS (Whole Genome Sequencing) sur la base de leurs profils de résistance. Les souches ont été séquencées par la société Helixio par technologie Illumina. 60 fichiers de données NGS (Next Gen Sequencing) brutes (séquences Forward et séquences Reverse) ont été traités: filtration des séquences en fonction de leur qualité puis création de génome par assemblage (outil SPAdes, <http://cab.spbu.ru/software/spades/>). Un typage MLST a confirmé leur appartenance au genre *Arcobacter*.

Sur les 30 souches d'*Arcobacter butzleri* envoyées à séquencer, 28 ont été conservées pour analyse. La taille des génomes séquencés varie de 2,08 Mpb à 2,48 Mpb, avec une moyenne de 2,28 Mpb. Ces valeurs concordent avec les données publiées sur les 13 souches d'*Arcobacter butzleri* disponibles dans Genbank, présentant également une moyenne de 2,27 Mpb. Le nombre de contigs moyen pour les 28 souches est de 40 (taille moyenne de 63Kpb), le GC% est de 28, avec en moyenne 2300 gènes annotés/génome.

Mécanisme associé à la résistance à l'ampicilline identifié chez *A. butzleri* : une β -lactamase (BLAOXA-464) présente sous deux formes a été identifiée : un gène entier (762 pb) et sa forme tronquée (~50% du gène). Cette β -lactamase a été identifiée à partir de l'annotation du génome de chacune des souches séquencées (annotations réalisées en parallèle avec Prokka <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24642063> et RAST <http://rast.nmpdr.org>). Les souches possédant le gène entier ont des CMI plus élevées et des diamètres plus bas à l'ampicilline par comparaison aux souches présentant le gène tronqué, à l'inverse (Figure 10).

La présence de cette β -lactamase a été vérifiée expérimentalement à partir des 72 autres souches appartenant aux collections du CNRCH. Des amorces ont été définies afin d'amplifier les deux versions du gène : une paire F1/R1 à chaque extrémité pour la version entière, une autre F2/R1 pour la version tronquée. En parallèle, des antibiogrammes et Etests ampicilline ont été effectués sur ces 72 souches.

Les souches congelées ont été repiquées sur milieu TSH et les antibiogrammes et Etests ampicilline réalisés sur milieu MHF (en microaérobie, à 35°C, pendant 24h). L'amplification a été réalisée par PCR à partir de lysats bactériens (tampon de lyse, à 100°C).

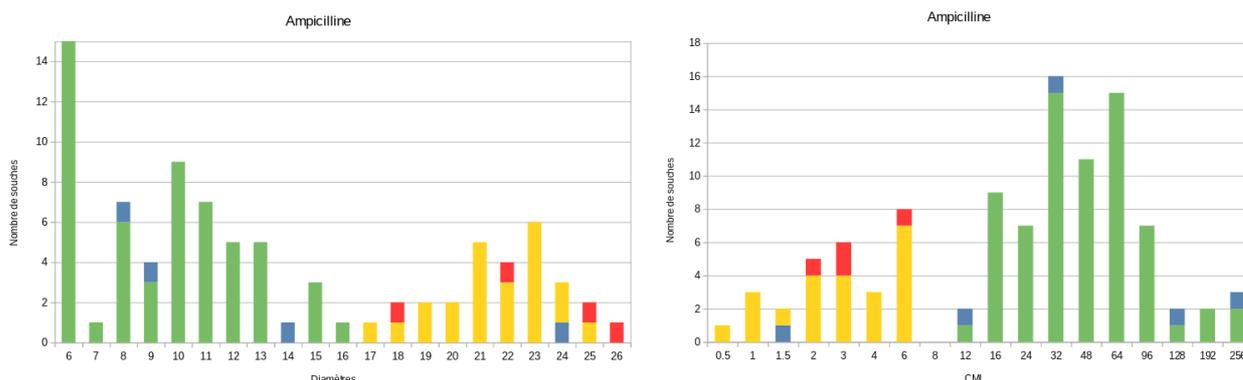


Figure 10 : Distribution des diamètres d’inhibition et CMI pour l’ampicilline de 102 souches de *A. butzleri*, en fonction des versions du gène *blaOXA-464* déterminées par PCR. En vert les souches dont le gène *blaOXA-464* a été amplifié avec F1 et F2 (gène entier), en bleu les souches dont le gène a été amplifié uniquement avec F1 (gène entier) et en jaune l’amplification avec F2 (gène tronqué). Les souches en rouge indiquent une absence d’amplification.

Sur la base de ces résultats, nous proposons que les « cut-offs » épidémiologiques à utiliser pour interpréter *in vitro* la sensibilité à l’ampicilline soit les suivants : R si diamètre < 16 mm ou R si CMI > 8 mg/L.

Mécanisme associé à la résistance à la ciprofloxacine identifié chez *A. butzleri* : une mutation dans le gène de la sous unité A de la gyrase a été identifiée en position 256 : séquence nucléotidique C256T ou séquence peptidique Thr86Ile. La présence de cette mutation est associée *in vitro* à la résistance à la ciprofloxacine (mutation retrouvée également chez d’autres espèces, tel *Escherichia coli* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC529191/>)).

La présence de cette mutation a été vérifiée par PCR et séquençage des produits de PCR générés avec un couple d’amorce encadrant la région cible (selon Abdelbaqi K *et al.*, FEMS Immunol Med Microbiol. 2007) dans 72 souches de la collection du CNRCH. Les résultats ont été analysés par rapport aux diamètres et aux CMI Ciprofloxacine (Figure 11).

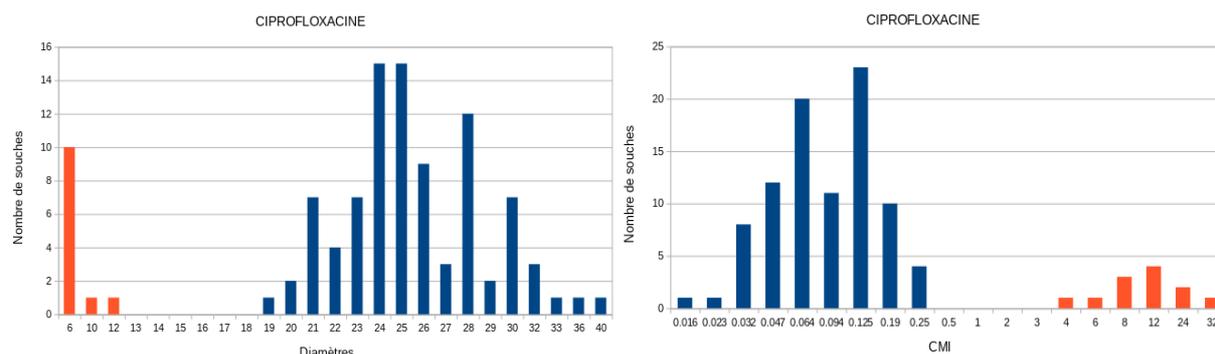


Figure 11 : Distribution des diamètres d’inhibition et CMI pour la ciprofloxacine de 102 souches de *A. butzleri*. En bleu les souches sans la mutation C256T (Thr86Ile), en orange les souches avec la mutation.

Les populations WT et R sont donc bien distinctes. Nous proposons les « cut-offs » épidémiologiques pour la ciprofloxacine suivants : R si diamètre < 19 mm ou R si CMI > 0,25 mg/L.

Mécanisme associé à la résistance à la tétracycline chez *A. butzleri* : aucun gène de résistance aux tétracyclines n’a été déterminé. Le gène de résistance *tetO*, associé à la résistance aux tétracyclines chez *Campylobacter*, n’a pas été retrouvé.

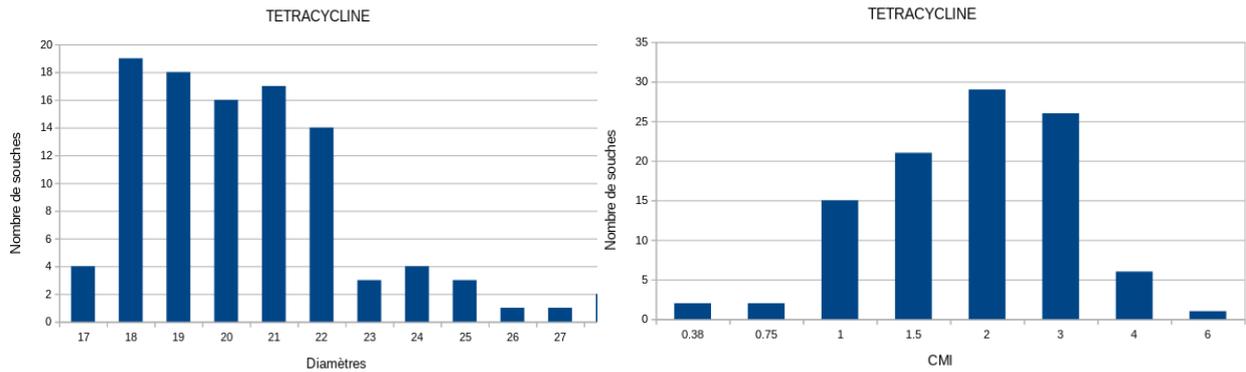


Figure 12 : Distribution des diamètres d'inhibition et CMI pour la tétracycline de 102 souches de *A. butzleri*

Nous ne pouvons donc pas proposer de «cut-off» pour interpréter la sensibilité *in vitro* aux tétracyclines pour *A. butzleri*. L'utilisation de tétracycline pour le traitement d'une infection entérique pourrait être proposée de manière probabiliste.

Mécanisme associé à la résistance à l'érythromycine chez *A. butzleri* : aucun gène de résistance aux macrolides n'a été identifié en particulier aucune mutation dans l'ADNr 23S pouvant apporter une résistance aux macrolides n'est présente. Plusieurs systèmes de pompes à efflux de type CME-ABC ont cependant pu être identifiés dans les génomes annotés sans pour autant être distribués au sein des souches présentant une moindre sensibilité *in vitro*.

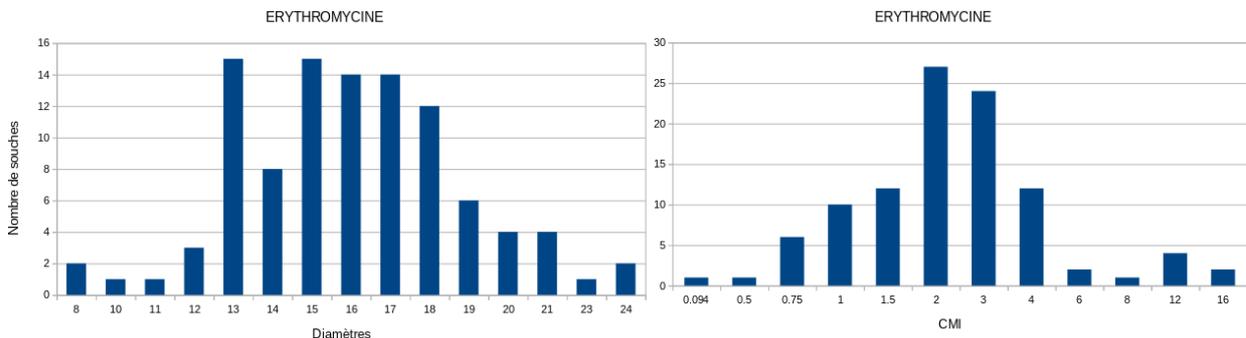


Figure 13 : Distribution des diamètres d'inhibition et CMI pour l'érythromycine de 102 souches de *A. butzleri*

Comme pour la tétracycline, nous ne pouvons donc proposer de «cut-off» pour interpréter la sensibilité *in vitro* aux macrolides pour *A. butzleri*. L'utilisation d'un macrolide pour le traitement d'une infection entérique pourrait être proposée de manière probabiliste.

3-Bilan des séquençages de 3 génomes de *Helicobacter sp* :

Le genre *Helicobacter* de la famille des *Helicobacteraceae* regroupe 42 espèces validées (33 avec des séquences génomiques complètes). De nouvelles espèces sont fréquemment proposées. Le CNRCH reçoit parfois de ses correspondants des isolats suspectés d'appartenir à de nouvelles espèces du genre *Helicobacter*. Nous présentons ici trois isolats que nous avons caractérisés récemment et dont l'ADN a été séquencé.

L'isolat 2005/566H a été isolé en 2005 dans les selles d'une patiente âgée de 60 ans présentant un carcinome hépatocellulaire et une gastro-entérite. L'isolat 48519 a été isolé en 2017 dans le sang d'un patient souffrant d'une bactériémie. L'isolat Cn23e a été isolé dans une biopsie gastrique chez un chien souffrant de gastrite chronique. Les deux isolats 2005/566h et Cn23e ont été isolés et cultivés au CNRCH, l'isolat 48519 a été isolé à l'hôpital Cochin. Les caractéristiques biochimiques et de croissance ont été étudiées, ainsi que leur morphologie en microscopie électronique. Après extraction d'ADN, les génomes de ces 3 isolats ont été séquencés (Illumina NextSeq500), alignés *de novo* et annotés. L'infectivité de la souche Cn23e a été étudiée dans la souris C57BL/6.

Les tailles des génomes des souches 2005/566H et Cn23e après filtration sont de 1,8 et 1,6 Mpb, avec 62 contigs chacun. La taille du génome de la souche 48519 après filtration est de 2,09 Mpb pour 42 contigs. Cette souche est suspectée d'appartenir à l'espèce *Helicobacter cinaedi*, dont le génome moyen pour les 3 seules souches publiées à ce jour est de 2,18 Mpb.

La phylogénie basée sur le produit du gène *gyrA* de ces souches place les souches 2005/566h (amphitriche à flagelles non gainés) et 48519 (amphitriche à flagelles gainés) parmi les *Helicobacter* entérohépatiques, respectivement proches de *H. valdiviensis* et de *H. cinaedi*, et la souche Cn23e parmi les *Helicobacter* gastriques, proche de *H. felis*. Cette dernière souche exprime une hippuricase active. Les analyses « average nucleotide identity » (ANI) et « DNA-DNA hybridization » (DDH) ont révélé que les deux premières souches séquencées n'appartenaient pas à des espèces connues, mais que Cn23e appartenait à l'espèce *H. felis*. Les génomes des souches 2005/566h et 48519 possédaient les trois gènes codant pour une CDT (*cdtA*, *cdtB* et *cdtC*) mais sans activité CDT détectable *in vitro* en modèle de coculture avec des lignées épithéliales intestinales. La souche Cn23e est capable d'infecter l'estomac de souris C57BL/6 et induit une forte réponse inflammatoire *in vivo*.

Nous confirmons que deux des trois isolats étudiés correspondent potentiellement à de nouvelles espèces du genre *Helicobacter*. Nous proposons deux nouvelles espèces du genre *Helicobacter* : *Helicobacter labetoulli* sp. Nov (souche 48519) et *Helicobacter burdigaliensis* sp. Nov (souche 2005/566h). Nous décrivons ici une nouvelle souche de *H. felis* (Cn23e) qui pourrait être utilisée en modèle murin et constitue donc une alternative potentielle à la souche CS1 (ATCC 49179) habituellement utilisée de par le monde. La famille des *Helicobacteraceae* n'a visiblement pas encore livré tous ses secrets.

Les images prises en microscopie électronique dans le cadre de ce projet ont été présentées lors du congrès annuel de la SFM en octobre 2018. Le CNRCH a remporté le prix du jury de la meilleure photo : <http://www.congres-sfm.fr/concoursphoto-692259.html>.

6.2.-Liste des publications et communications de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Les noms des membres du CNR sont surlignés en gris.

Les communications ayant un lien avec une activité recherche à cheval entre le CNR et l'équipe INSERM U1053 « Infection à *Helicobacter* : inflammation et cancer » sont indiquées à part.

-Publications

Publications internationales

- 1-E Bessède, J Asselineau, P Perez, G Valdenaire, O Richer, P Lehours, F Mégraud. Evaluation of the diagnostic accuracy of 2 immunochromatographic tests detecting *Campylobacter* in stools and their role in *Campylobacter* infection diagnosis. J Clin Microbiol 2018 018 Feb 7. pii: JCM.01567-17. doi: 10.1128/JCM.01567-17. [Epub ahead of print]
- 2-Bénéjat L, Sifré E, Domingues Martins C, Ducournau A, Buissonnière A, Bessède E, Mégraud F, Lehours P. Epidemiological cut-off values to separate wildtype from non-wildtype *Campylobacter fetus* to ciprofloxacin. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018 Oct;92(2):164-167. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.012. Epub 2018 May 18. Auteur responsable.
- 3-A Buissonnière, L Bénéjat, P Charron, E Bessède, P Lehours, G Valdenaire, O Richer, F Mégraud. A new kit to detect 1 species in stool specimens: the Orion GenRead *Campylobacter*. Eur J Clin Microb Infect Dis. 2018 Jun 3. doi: 10.1007/s10096-018-3288-5. [Epub ahead of print]
- 4-A. Fabre, M. Oleastro, A. Nunes, A. Santos, E. Sifré, A. Ducournau, L. Bénéjat, A. Buissonnière, P. Floch, F. Mégraud, V. Dubois and P. Lehours. Whole-genome sequence analysis of multidrug resistant *Campylobacter* spp. isolates: a focus on aminoglycoside resistance determinants. J Clin Microbiol 2018 Aug 27;56(9). pii: e00390-18. doi: 10.1128/JCM.00390-18. Print 2018 Sep. Auteur responsable.
- 5-Bénéjat L, Ducournau A, Lehours P, Mégraud F. Real-time PCR for *Helicobacter pylori* diagnosis. The best tools available. Helicobacter. 2018 Aug 28:e12512. doi: 10.1111/hel.12512. [Epub ahead of print]
- 6-J. Kedra, V. Zeller, B. Heym, P. Lehours, V. Meyssonier, S. Lariven, Lucie Bruhl-Bénéjat, S. Marmor, JM. Ziza. A Case of Recurrent *Helicobacter cinaedi* Prosthetic Joint Infection In An HIV-Infected Man. J. Bone Joint Infect. 2018 Oct 4;3(4):230-233. doi: 10.7150/jbji.28375. eCollection 2018.
- 7-Courtois S, Bénéjat L, Izotte J, Mégraud F, Varon C, Lehours P, Bessède E. Metformin can inhibit *Helicobacter pylori*

- growth. *Future Microbiol.* 2018 Nov 13. doi: 10.2217/fmb-2018-0184. [Epub ahead of print]
- 8-Bordin DS, Embutnieks YV, Vologzhanina LG, Il'chishina TA, Voinovan IN, Sarsenbaeva AS, Alekseenko SA, Zaitsev OV, Abdulkhakov RA, Osipenko MF, Livzan MA, Tsukanov VV, Burkov SG, Bakulina NV, Dekhnich NN, Tarasova LV, Plotnikova EY, Maev IV, Kucheryavyi YA, Baryshnikova NV, Butov MA, Kolbasnikov SV, Pakhomova AL, Zhestkova TV, Baranovskii AY, Abdulkhakov SR, Ageeva EA, Lyalyukova EA, Vasyutin AV, Golubev NN, Savilova IV, Morkovkina LV, Kononova AG, Mégraud F, O'Morain C, Ramas M, Nyssen OP, McNicholl AG, Gisbert JP. European Registry on the management of *Helicobacter pylori* infection (Hp-EuReg): analysis of 2360 patients receiving first-line therapy in Russia. *Ter Arkh.* 2018 Feb 15;90(2):35-42. doi: 10.26442/terarkh201890235-42.
- 9-Berthenet E, Yahara K, Thorell K, Pascoe B, Meric G, Mikhail JM, Engstrand L, Enroth H, Burette A, Mégraud F, Varon C, Atherton JC, Smith S, Wilkinson TS, Hitchings MD, Falush D, Sheppard SK. A GWAS on *Helicobacter pylori* strains points to genetic variants associated with gastric cancer risk. *BMC Biol.* 2018 Aug 2;16(1):84. doi: 10.1186/s12915-018-0550-3.
- 10-Dion, J., Bénéjat, L., Mégraud, F., Wargnier, A., Boutboul, D., Galicier, L., Le Moing, V., Giraud, P., Jaccard, A., Nove-Josserand, R., Fieschi, C., Oksenhendler, E., Gérard, L., DEFI study group. *Campylobacter infection* in adult patients with primary antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018 Jul 6. pii: S2213-2198(18)30415-X. doi: 10.1016/j.jaip.2018.06.014. [Epub ahead of print].
- 11-Bachir, M., Allem, R., Bénéjat, L., Tifrit, A., Medjekane, M., Drici, AE., Mégraud, F., Douidi, K.T. Molecular detection of mutations involved in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Algeria. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73:2034-2038.
- 12-Thépault, A., Guyard-Nicodème, M., Rose, V., Quesne, S., Queguiner, M., Houard, E., Mégraud, F., Rivoal, K., Chemaly, M. A representative overview of the genetic diversity and lipooligosaccharide sialylation in *Campylobacter jejuni* along the broiler production chain in France and its comparison with human isolates. *Int J Food Microbiol.* 2018;274:20-30.
- 13- Asselineau J, Paye A, Bessède E, Perez P, Proust-Lima C. Different latent class models were used and evaluated for assessing the accuracy of campylobacter diagnostic tests: overcoming imperfect reference standards? *Epidemiol Infect.* 2018 Sep;146(12):1556-1564. doi: 10.1017/S0950268818001723. Epub 2018 Jun 27. PMID : 29945689.
- 14- Shield KD, Marant Micallef C, de Martel C, Heard I, Mégraud F, Plummer M, Vignat J, Bray F, Soerjomataram I. New cancer cases in France in 2015 attributable to infectious agents: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol.* 2018 Mar;33(3):263-274.

Publications didactiques

- 1-Lehours P. Actual diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2018 Apr 12. doi: 10.23736/S1121-421X.18.02494-7. [Epub ahead of print]
- 2-Vale FF, Lehours P. Relating Phage Genomes to *Helicobacter pylori* Population Structure: General Steps Using Whole-Genome Sequencing Data. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 21;19(7). pii: E1831. doi: 10.3390/ijms19071831. Review.
- 3-Blosse A, Lehours P, Wilson KT, Gobert AP. *Helicobacter*: Inflammation, immunology, and vaccines. *Helicobacter.* 2018 Sep;23 Suppl 1:e12517. doi: 10.1111/hel.12517. Review.
- 4-Mégraud, F. Antibiotic resistance is the key element in treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology.* 2018;155:1300-1302.
- 5-Skrebinska, S., Mégraud, F., Bessède, E.. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2018 Sep;23 Suppl 1:e12515. doi: 10.1111/hel.12515.
- 6-Pellicano, R., Ribaldone, D.G., Astegiano, M., Dughera, L., Battaglia, E., Morgando, A., Arrigoni, A., Spandre, M., Grassini, M., Saracco, G.M., Mégraud, F. Gastroenterology today: between certainties and news. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2018;64:323-332.

Liste des publications de formation

- 1-F. Mégraud, E. Bessède, P. Lehours. Diagnostic des infections à *Helicobacter pylori* au laboratoire. EMC -Biologie médicale 2018;1-6 [Article 90-05-0190-A]."
- 2-Mégraud, F. *Helicobacter pylori*, Chapitre No. 79. Précis de bactériologie clinique, 3e édition. Riegel, P. "Ed.), 2018. ESKA, Paris.
- 3-P Lehours-Participation en 2018 à la mise en ligne des MOOCs : powerpoint commenté oralement de diapositives pour la mise en place du parcours d'e-learning de la phase socle du DESBM, option « agents infectieux » sur le thème «Campylobacter» (en collaboration avec Hélène Marchandin, Montpellier).

Publications de recherche pour l'équipe INSERM U1053 adossée au CNR et de l'expertise en microbiologie des biologistes du CNRCH au laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin

- Ouldali N, Levy C, Varon E, Bonacorsi S, Béchet S, Cohen R, Angoulvant F; French Pediatric Meningitis Network. Incidence of paediatric pneumococcal meningitis and emergence of new serotypes: a time-series analysis of a 16-year French national survey. *Lancet Infect Dis*. 2018 Jul 23. pii: S1473-3099(18)30349-9. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30349-9. [Epub ahead of print].
- Demazeau G, Plumecocq A, Lehours P, Martin P, Couëdelo L, Billeaud C. A New High Hydrostatic Pressure Process to Assure the Microbial Safety of Human Milk While Preserving the Biological Activity of Its Main Components. *Front Public Health*. 2018 Nov 6;6:306. doi: 10.3389/fpubh.2018.00306. eCollection 2018.
- Goret J, Baudinet T, Camou F, Issa N, Gaillard P, Wirth G, Greib C, Barandon L, Mégraud F, Bébéar C, Peuchant O, Ménard A. Identification of *Streptococcus sinensis* from a patient with endocarditis using MALDI-TOF mass spectrometry, 16S rDNA- and sodA-based phylogeny. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018 May 29. pii: S1684-1182(18)30125-7. doi: 10.1016/j.jmii.2018.04.004. [Epub ahead of print].
- Goret J, Blanchi J, Floch P, Peuchant O, Chriment D, Sanchez R, Biessy H, Lemarié R, Leyssene D, Louf B, Mimouni S, Flao T, Bébéar C, Mégraud F. Impact of the introduction of a nucleic acid amplification test for *Clostridium difficile* diagnosis on stool rejection policies. *Gut Pathog*. 2018 May 30;10:19. doi: 10.1186/s13099-018-0245-x. eCollection 2018.

-Communications nationales

Oraux

- Naïma Raaf, Samiha Mehasni, Wahiba Amhis, Lucie Bénéjat, Francis Mégraud. Prevalence et distribution des facteurs de virulence de *Helicobacter pylori* dans la population Algérienne. Réunion du GEFH. Tours Janvier 2018.
- E Berthenet, A Thépault, M Chemaly, K Rivoal, A Ducournau, A Buissonnière, L Bénéjat, E Bessède, F Mégraud, SK Sheppard, P Lehours. Source attribution of french clinical isolates of *Campylobacter jejuni*. Congrès national de la Société Française de Microbiologie, 1-3 Octobre 2018, Paris.
- E Berthenet, A Thépault, M Chemaly, K Rivoal, A Ducournau, A Buissonnière, L Bénéjat, E Bessède, F Mégraud, SK Sheppard, P Lehours. Source attribution of french clinical isolates of *Campylobacter jejuni*. 38^{ème} congrès de la RICAI, 17-18 Décembre 2018, Paris.
- Tiffon C., Molina-Castro S., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Study of the Hippo/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced by *Helicobacter pylori* infection. Congrès annuel du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, Poitiers, 26 janvier 2018.
- Giraud J, Bouriez D., Sifré E, Rousseau B, Seeneevassen L., Mégraud F, Lehours P, Dubus P, Gronnier C, Varon C. Development of New Mice Models of Patient Derived Orthotopic Xenograft for Studying Cancer Stem Cells Driving Gastric Cancer Metastasis. Congrès du cancéropôle GSO, La Grande Motte, 21-23 novembre 2018.
- Giraud J, Rousseau B, Gronnier C, Molina-Castro S, Sifré E, Dubus P, Lehours P, Mégraud F, Varon C. CD44V, a population of migrating Cancer Stem Cell in gastric adenocarcinomas ?. Journée scientifique de la Fédération de recherche Transbiomed, Bordeaux, 4 décembre 2018.

Posters

- P Lehours, T Gueudet, A Buissonnière, A Trens, JM Roussée, L Bruhl, A Ducournau, E Bessède, F Mégraud. Comment interpréter un résultat de PCR *Campylobacter* isolément positif en approche syndromique ? Evaluation au CNR *Campylobacters*. 38^{ème} congrès de la RICAI, 17-18 Décembre 2018, Paris.
- P Lehours, A Buissonnière, A Ducournau, E Bessède, F Mégraud. Antibiogramme de *Campylobacter* sur milieux MHF : évaluation des performances de 3 milieux commercialisés. 38^{ème} congrès de la RICAI, 17-18 Décembre 2018, Paris.
- P Lehours, L Bruhl, A Ducournau, A Buissonnière, E Bessède, F Mégraud. Evaluation of a commercialized MH-F medium in comparison with an in-house 10% sheep blood MH medium to perform antibiograms on *Helicobacter pylori*. 38^{ème} congrès de la RICAI, 17-18 Décembre 2018, Paris.
- P Lehours, A Ducournau, E Bessède, F Mégraud. Evaluation des performances du milieu chromogène *Campylobacter* CASA (bioMérieux) 38^{ème} congrès de la RICAI, 17-18 Décembre 2018, Paris.
- P Lehours, T Gueudet, A Buissonnière, A Trens, JM Roussée, L Bruhl, A Ducournau, E Bessède, F Mégraud. Comment interpréter un résultat de PCR *Campylobacter* isolément positif en approche syndromique ? Evaluation au CNR *Campylobacters*. Congrès national de la Société Française de Microbiologie, 1-3 Octobre 2018, Paris.
- P Lehours, A Buissonnière, A Ducournau, E Bessède, F Mégraud. Antibiogramme de *Campylobacter* sur milieux MHF : évaluation des performances de 3 milieux commercialisés. Congrès national de la Société Française de Microbiologie, 1-3 Octobre 2018, Paris.

-P Lehours, L Bruhl, A Ducournau, A Buissonnière, E Bessède, F Mégraud. Evaluation of a commercialized MH-F medium in comparison with an in-house 10% sheep blood MH medium to perform antibiograms on *Helicobacter pylori*. Congrès national de la Société Française de Microbiologie, 1-3 Octobre 2018, Paris.

-P Lehours, A Ducournau, E Bessède, F Mégraud. Evaluation des performances du milieu chromogène Campylobacter CASA (bioMérieux). Congrès national de la Société Française de Microbiologie, 1-3 Octobre 2018, Paris.

-E Berthenet, A Ménard, C Varon, S Lacomme, E Gontier, J Raymond, F Mégraud, B Ouahiba, A Ducournau, A Buissonnière, L Bénéjat, A Giese, E Bessède, P Lehours. Whole-genome sequencing of three strains suspected to belong to novel *Helicobacter species*. Congrès national de la Société Française de Microbiologie, 1-3 Octobre 2018, Paris.

-Tiffon C., Molina-Castro S.E., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Study of the Hippo/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced in response to *Helicobacter pylori* infection. Congrès du cancérpôle GSO, La Grande Motte, 21-23 novembre 2018.

-Giraud J, Rousseau B, Gronnier C, Molina-Castro S, Sifré E, Dubus P, Lehours P, Mégraud F, Varon C. CD44V, a population of migrating Cancer Stem Cell in gastric adenocarcinomas ?. Journée scientifique de la Fédération de recherche Transbiomed, Bordeaux, 4 décembre 2018.

-Seeneevassen L., Giraud J., Molina-Castro S.E., Tiffon C., Martin O., Boeuf H., Staedel C., Mégraud F., Lehours P., Dubus P., Varon C. Role of leukemia inhibitory factor (LIF) on the tumorigenic and invasive properties of cancer stem cells in gastric carcinomas. Journée scientifique de la Fédération de recherche Transbiomed, Bordeaux, 4 décembre 2018.

-H. Lamouliatte, F. Mégraud. Avec une quadri-thérapie bismuthée, les taux d'éradication de *H. pylori* sont très élevés et stables dans la durée JFHOD. Paris Mars 2018.

-Communications internationales

Oraux

-Molina-Castro S, Giraud J, Tiffon C, Bœuf H, Sifré E, Giese A., Belleannée G., Lehours P, Bessède E., Mégraud F, Dubus P, Staedel C, Varon C. AT2 negatively regulates inflammatory cytokine production in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells. XXXIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in inflammation and Cancer. Kaunas, Lithuania, 13-16 septembre 2018.

W. He, L. Azzi-Martin, C. Alix, M. Mergni, P. Lehours, P. Dubus, A. Ménard. Study of autophagy induced by Cytotoxin-producing Distending Toxin-secreting bacteria. XXXIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in inflammation and Cancer. Kaunas, Lithuania, 13-16 septembre 2018.

-Tiffon C., Peru S., Molina-Castro S., Giraud J., Staedel C., Dubus P., Lehours P., Mégraud F., Varon C. Study of the Hippo/YAP/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced by *Helicobacter pylori* infection. Fit for the future in gastroenterology, European GI Bridging Meeting, Berlin, Allemagne, 29-30 novembre 2018.

Posters

-P. Lehours, M. Oleastro, A. Nunes, N. Liassine, D.M. Lowe, G. Godbole. Recurrent *Campylobacter jejuni* infections with *in vivo* selection of resistance to macrolides and carbapenems: molecular characterisation of resistance determinants. 28th ECCMID, Madrid, Spain, 2018. (P3791).

-S. Courtois, L. Bénéjat, F. Mégraud, C. Varon, P. Lehours, E. Bessède. An unexpected effect of metformin against *H. pylori* growth. 28th ECCMID, Madrid, Spain, 2018. (P1535).

-P Lehours, A Ducournau, E Bessède, F Mégraud. Evaluation des performances du milieu chromogène Campylobacter CASA (bioMérieux). XXXIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in inflammation and Cancer. Kaunas, Lithuania, 14-15 septembre 2018.

-E Berthenet, A Ménard, C Varon, S Lacomme, E Gontier, J Raymond, F Mégraud, B Ouahiba, A Ducournau, A Buissonnière, L Bénéjat, A Giese, E Bessède, P Lehours. Whole-genome sequencing of three strains suspected to belong to novel *Helicobacter species*. XXXIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in inflammation and Cancer. Kaunas, Lithuania, 14-15 septembre 2018.

-Conférences sur invitations

-P Lehours

-14^{ème} journée de la Cancérpôle Grand Sud Ouest, La Grande Motte, 21-23 novembre 2018. « Impact of *Helicobacter* sp infection on gastric lymphomagenesis and microbiota » et modération de la session Microbiote et Cancer. (Modérateur de session+orateur)

-26^{ème} réunion du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, Tours, Janvier 2018. Microbiote gastrique et intestinal en modèle murin de lymphome induit par Helicobacter : faut-il aussi s'intéresser à Escherichia coli ? (Modérateur de session+orateur)

-F Mégraud

- 26^{ème} Réunion du Groupe d'Etudes Français des Helicobacters (GEFH). Tours. 26 janvier 2018. Modérateur.
- 17^{ème} Cours d'Hépatogastroentérologie du Centre de Formation Post-graduate de l'Organisation Mondiale de Gastroentérologie. Rabat, Maroc. 29-30 janvier 2018. Conférence.
- 9^{ème} Journée Régionale de Biologie Médicale Poitou-Charentes. Saintes. 8 février 2018. Conférence.
- Commonwealth of Independent States Summit. Almaty, Kazakhstan. 23-25 février 2018. Conférence.
- Journées Françaises d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD). Atelier Mayoly Spindler. Paris. 22-23 mars 2018. Conférence.
- VIII Latin-American Symposium on *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Belo Horizonte, Brésil. 12-14 avril 2018. Conférence.
- 51st Annual Meeting of the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). Genève, Suisse. 9-12 mai 2018. Conférence.
- Upper GI Disorders Guidelines & Clinical Practice in Central-Eastern Europe. Siofok, Hongrie. 1^{er} juin 2018. Conférence.
- 17th European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases Summer School. Paris. 6-7 juillet 2018. Conférence.
- GI Emergencies meeting. The role of gut microbiota. Rome, Italie. 12 juillet 2018. Conférence.
- Post-graduate Course of the 32nd European Helicobacter & Microbiota Study Group Workshop. Kaunas, Lituanie. 11-15 septembre 2018. Conférence.
- 1^{ère} Journée du Centre National de Référence des Campylobacters et Helicobacters. Paris. 18 septembre 2018. Conférence.
- 26th United European Gastroenterology Week. Vienne, Autriche. 20-24 octobre 2018. Conférences – Modérateur.
- Conférence sur l'adaptation des recommandations sur la prise en charge de l'infection à *Helicobacter pylori* (Maastricht V) à un pays à ressources limitées. Yerevan, Arménie. 1-3 novembre 2018. Conférence.
- European Bridging Meeting in Gastroenterology. Berlin, Allemagne. 30 novembre – 1^{er} décembre 2018. Conférence.
- Congrès BacTouBac, Toulouse, France. 11-12 décembre 2018. Conférence.
- 4^e Congrès Maghrébin de Gastroentérologie. Tunis, Tunisie. 13-15 décembre 2018. Conférence.
- 1^{ère} Gastro Académie du Grand Ouest. Angers. 14-15 décembre 2018. Conférence.

7-Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Une collaboration existe avec le Laboratoire National de Référence (LNR) des Campylobacters de l'ANSES de Ploufragan. Ce laboratoire s'intéresse aux isolats de Campylobacters provenant des élevages de volailles et de porcs, des abattoirs correspondants, des étals du commerce et de l'environnement.

- Participation de deux membres du CNR (F. Mégraud et P. Lehours) à deux comités de thèse du LNR :
 - 1- Recherche et caractérisation d'antigènes vaccinaux contre *Campylobacter* par vaccinologie inverse (F. Mégraud) ;
 - 2- Capacité de différents outils de typage moléculaire pour tracer *Campylobacter jejuni* et identifier l'origine de contamination en cas de campylobactériose (P. Lehours).
- Participation d'un membre du CNR (F. Mégraud) à un jury de thèse du LNR (10 janvier 2018) Ploufragan sur le sujet : «Capacité de différents outils de typage moléculaire pour tracer *Campylobacter jejuni* et déterminer l'origine de contamination en cas de campylobactériose».
- Participation de E Bessède au un jury de thèse de Pharmacie de Clémence Corlouer « Les méthodes rapides de microbiologie : enjeux et implémentation dans les laboratoires de contrôle qualité des industries pharmaceutiques. Exemple de l'implémentation de la technologie MALDI-TOF chez Sanofi Pasteur », soutenance le 24/09/2018.
- Transfert de séquences génomiques réalisées par le LNR de *Campylobacter jejuni* isolés de cas cliniques par le CNR.

- CNR co-auteur d'une publication :

Amandine Thépault, Muriel Guyard-Nicodème, Valérie Rose, Ségolène Quesne, Marilyne Queguiner, Emmanuelle Houard, Francis Mégraud, Katell Rivoal, Marianne Chemaly. 2018. A representative overview of the genetic diversity and lipooligosaccharide sialylation in *Campylobacter jejuni* along the broiler production chain in France and its comparison with human isolates. *International Journal of Food Microbiology* 274, 20–30.

-Perspectives 2019-2020 :

Continuer les échanges scientifiques avec le CNR et répondre à des appels à projets pour poursuivre et renforcer nos collaborations (cf projet 2019-2020).

8-Programme d'activité pour les années suivantes

-Projets 2020-2021 concernant les Campylobacters et bactéries apparentées (hors NGS)

-Etude MAGIC

Les gastro-entérites sont fréquentes chez l'enfant et majoritairement d'origine virale en Europe. Cependant les gastro-entérites d'origine bactérienne sont surreprésentées parmi les décès consécutifs de gastro-entérites. Un mécanisme entéro-invasif est plus souvent associé à une origine bactérienne. Cependant, selon les recommandations Européennes et Françaises, peu de diarrhées bactériennes nécessitent une antibiothérapie en dehors des Shigelloses, des formes graves de Salmonelloses et des infections symptomatiques à *Campylobacter* diagnostiquées précocement. En effet, une grande partie des diarrhées bactériennes guérissent spontanément et l'utilisation non justifiée d'antibiotiques favorise l'émergence de résistances bactériennes. L'Organisation Mondiale de la Santé vient de définir comme priorité l'émergence de résistances aux fluoroquinolones des *Shigella* spp, *Salmonella* spp et *Campylobacter* spp. Actuellement le diagnostic bactériologique de référence reste la coproculture, dont les résultats ne peuvent être transmis que dans les trois à quatre jours après la réalisation du prélèvement. Cependant, de nouvelles méthodes plus rapides ont été développées. La PCR multiplex BD MAX™ Bactéries Entériques permet, avec de bonnes performances diagnostiques de donner un résultat en une heure environ pour les bactéries les plus fréquemment rencontrées. Le but de l'étude est de déterminer si l'utilisation de cette PCR dans le cadre des diarrhées entéro-invasives de l'enfant pourrait permettre une meilleure adéquation de la prise en charge. Notamment si la PCR multiplex permet une amélioration du devenir des enfants avec le traitement non retardé des diarrhées bactériennes le nécessitant, mais également l'épargne d'une antibiothérapie pour les enfants permettant ainsi de limiter les perturbations du microbiote intestinal et l'émergence de résistances bactériennes.

L'étude MAGIC se fera en collaboration avec les urgentistes pédiatres du CHU de Bordeaux. Cette étude a pour but de déterminer l'impact de l'utilisation d'une PCR Multiplex sur la prise en charge et le devenir clinique des enfants présentant une gastro-entérite invasive aiguë aux urgences pédiatriques. Il s'agit d'un essai clinique randomisé de 2 stratégies diagnostiques.

Il s'agit donc de comparer l'impact de deux stratégies diagnostiques (coproculture vs. coproculture et PCR multiplex) sur la prise en charge des enfants reçus aux urgences pédiatriques pour GEA entéro-invasive.

Les objectifs secondaires sont de comparer dans les deux groupes de stratégie :

- le pourcentage de prescription d'antibiotiques non justifiée selon les recommandations, à la sortie des urgences ;
- le retard à la mise en place d'une antibiothérapie lorsqu'elle est recommandée ;
- l'adaptation de la nature de l'antibiothérapie prescrite lorsqu'elle est recommandée ;
- le retentissement clinique sur l'enfant ;
- le coût des deux stratégies et la charge de travail épargnée pour les laboratoires de bactériologie.

Pour réaliser ce projet, une convention de recherche va être établie avec BD qui nous mettra à disposition l'automate BD MAX permettant la réalisation des tests de PCR Multiplex.

-Participer à l'évaluation de tout nouveau kit de diagnostic (recherche d'antigènes, nouveaux kits ELISA etc...) ou PCR pour recherche des Campylobacters, notamment les PCR syndromiques :

Projet d'évaluation de la technologie Novodiag® (Mobidiag) dans le diagnostic syndromique moléculaire des diarrhées infectieuses aiguës bactériennes : mémoire de fin d'internat, thèse de Pharmacie de Mr Charly Roy (directeur de thèse P Lehours).

Il est prévu de tester deux cent cinquante (250) échantillons par Novodiag® BGE en comparaison avec la culture. Ceci permettra de définir la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et négative du test Novodiag® BGE.

En cas de discordance, les résultats pourront être comparés à ceux obtenus par PCR commerciale (r-biopharm) et/ou par PCR en temps réel maison du CNRCH.

-Participation au PHRC REBALANCE :

L'AP-HP est promoteur d'un essai clinique intitulé : « Impact de la transplantation de microbiote fécal chez des patients atteints de rectocolite hémorragique : étude randomisée et contrôlée (REBALANCE-UC) », coordonné par le Professeur Harry Sokol, gastro-entérologue à l'hôpital Saint-Antoine à Paris.

Cet essai clinique s'intéresse à l'efficacité de la transplantation de microbiote fécal chez des patients atteints de rectocolite hémorragique en rémission sous traitement conventionnel (corticothérapie).

L'AP-HP se charge pour cet essai clinique, à la fois du recrutement et du suivi des patients dans 11 centres associés différents (total de patients randomisés attendus = 126) et du recrutement et du suivi des donneurs volontaires sains dans 1 centre uniquement, le LRIPH du CRC-Est (Lieu de Recherche Impliquant la Personne Humaine du Centre de Recherche Clinique, Paris est) à l'hôpital Saint-Antoine.

En vue d'utiliser des dons de selles pour de la transplantation de microbiote fécal chez des patients, les donneurs volontaires sains participants à la recherche sont soumis à un bilan de dépistage complet (sang et selles) selon les recommandations de l'ANSM.

Parmi les différents germes recherchés, notre CNR sera le centre expert pour la recherche de *Campylobacter sp.*

La technique de référence demandée par l'ANSM est la méthode de recherche par ELISA. La recherche de *Campylobacter sp* à réaliser pour chaque bilan de dépistage, sera également réalisée en parallèle par une méthode de PCR spécifique et par une méthode de culture à partir des échantillons de selles.

Ce protocole permettra d'étudier et de faire évoluer les connaissances actuelles sur les techniques de diagnostic à utiliser dans ces dépistages *Campylobacter sp* et notamment de placer la PCR dans ce contexte.

-Comparer les niveaux de résistance des *Campylobacters* humains et vétérinaires (collaboration avec le LNR *Campylobacter*). Depuis 2014, des prélèvements sont faits en abattoirs : poulets et dindes les années paires, porcs et veaux les années impaires. Seule la surveillance de la résistance des *C. jejuni* de volailles est obligatoire pour l'EFSA, à l'heure actuelle. La dernière campagne de prélèvement a eu lieu en 2016 et reprendra en 2018. Nous pourrions donc en 2019 comparer nos résultats.

-Élargir notre réseau de correspondants afin d'intégrer les quelques départements encore non couverts en 2018. Les CHU, CHG et gros laboratoires privés seront contactés.

-Accréditer l'identification MALDI-TOF et les antibiogrammes des *Campylobacters* et bactéries apparentées.

-Faire valider par le CASFM-EUCAST les « cut-offs » épidémiologiques déterminés au CNRCH pour interpréter les antibiogrammes des *Arcobacters*.

-Mettre à jour la base du MALDI-TOF afin d'intégrer toutes nouvelles espèces de *Campylobacter* et de tenter d'identifier les sous-espèces de *Campylobacter*.

-Organiser chaque année une journée des correspondants du CNR (la première réunion a eu lieu à Paris en septembre 2018)

-Former à la demande tout personnel (biologiste, technicien...) à au diagnostic bactériologique des infections à *H. pylori*.

-Projets 2019-2020 concernant *H. pylori* et les Hélicobacters (hors NGS)

- Accréditer en priorité la PCR et la culture de *H. pylori*.
- Elargir notre réseau de correspondants en commençant par faire appel aux nombreux correspondants des réseaux Campylobacters.
- Publier les résultats du protocole Français de surveillance de la résistance aux antibiotiques en France (protocole PHARE). But : 1 000 cas, 3^{ème} année.
- Publier les résultats du 4^{ème} protocole Européen de surveillance de la résistance aux antibiotiques en Europe, année 2018. 25 centres – 18 pays. 50 souches/centre. Protocole standardisé.
- Proposer au CASFM et à l'EUCAST des milieux pré-coulés commerciaux et une méthode standardisée pour proposer une solution aux laboratoires ne pouvant préparer leurs propres milieux de culture et souhaitant réaliser les antibiogrammes de *H. pylori*.
- Participer à l'évaluation de tout nouveau kit de diagnostic (recherche d'antigènes, nouveaux kits ELISA etc...) ou PCR pour recherche de *H. pylori*. Nous avons été sollicités début 2019 par plusieurs sociétés souhaitant commercialiser de nouveaux formats de détection antigénique de *H. pylori* dans les selles et de nouveaux formats de PCR temps réel à partir de biopsies gastriques.
- Vérifier les discordances rencontrées par certains correspondants du CNR entre la sensibilité *in vitro* de *H. pylori* aux macrolides et les résultats de génotypage par PCR commerciale.
- Former à la demande tout personnel (biologiste, technicien...) à au diagnostic bactériologique des infections à *H. pylori*.
- Continuer à participer à toute discussion utile à la mise à la nomenclature de la PCR de détection de *H. pylori* auprès de la Haute Autorité de Santé (HAS) et de la Commission de hiérarchisation des actes de biologie (CHAB). Nous avons été sollicités par l'HAS début 2019 pour notre expertise dans ce domaine suite à une auto-saisine de l'HAS sur la place des différents tests de diagnostic des infections à *H. pylori*.
- Définir le mécanisme d'action anti-*H. pylori* de la metformine (collaboration avec IG Boneca, Institut Pasteur Paris).
- Participer au HP genome projet
Ce projet consiste à l'analyse des séquences de souches provenant de malades atteints de cancer gastrique ou de gastrite isolée, d'un grand nombre de pays du monde entier. A ce jour 281 souches de 13 pays ont été séquencées.
Seront appréciées dans ce projet les variations génomiques et épigénomiques selon la pathologie, le core génome et le pangénome, la présence de systèmes de restriction-modification, etc...
Le CNRCH sera impliqué dans l'étude des mutations associées à la résistance aux antibiotiques notamment leur prévalence en fonction des populations.
- Réaliser une étude de prévalence des infections à *Campylobacter sp* et *H. pylori* dans la population générale Française en utilisant les donneurs de sang :
 - sélection de 10 EFS répartis sur le territoire ;
 - obtention de 20 sérums pour 5 tranches d'âge de 10 ans (de 20 à 70 ans =100) dans chaque EFS ;
 - réalisation de la sérologie *H. pylori* et *C. jejuni* par ELISA.Cette étude est dépendante de l'obtention d'une subvention pour acheter les kits de détection. Elle est motivée par notre ignorance de l'état actuel de la prévalence.

-Projets en rapport avec l'activité NGS

- Prochaines campagnes de séquençage envisagées :
Le CNR reçoit chaque année des souches de *Campylobacter sp*, *Helicobacter sp* et *Arcobacter sp* de plus en plus nombreuses venant de toute la France. Le développement de l'activité de séquençage et d'analyses de génomes

permettra de mettre en place différents projets utiles à l'activité du CNR. Ainsi, des séquençages réguliers de souches permettront de mettre en place des analyses de surveillance de l'évolution des attributions de source ou d'émergence de profils de résistances particuliers. Pour l'année 2019, le CNR aimerait séquençer différentes souches dans le cadre de projets futurs :

- des souches de *C. coli*, afin d'étudier la possibilité de définir des marqueurs d'attribution tels que décrits chez *Campylobacter jejuni* et d'établir un profil des réservoirs à l'origine des contaminations par *C. coli* en France (cf ci-après) ;
- des souches de *C. jejuni* isolées en 2018, afin de poursuivre la surveillance annuelle de l'évolution des réservoirs à l'origine des contaminations par *C. jejuni* en France. Cette étude annuelle devra inclure régulièrement (tous les 5 ans minimum) des souches prélevées dans les différents réservoirs à des périodes similaires afin de vérifier que les marqueurs d'attribution sont toujours pertinents. Une collaboration avec le LNR de Ploufragan pourra être mise en place dans cette optique ;
- des souches de *C. jejuni* provenant de cas groupés, afin de poursuivre l'étude de ces cas groupés à l'échelle du génome et de confirmer les cas groupés analysés par RAPD ;
- toutes nouvelles souches de *Helicobacter*, *Campylobacter* ou *Arcobacter* suspectées d'appartenir à de nouvelles espèces, afin de participer à la caractérisation de nouvelles espèces.

-Projet collaboratif avec le LNR-Campylobacter : NGS *C. coli*-Projet CampySource 2

Le projet CampySource2 s'inscrit dans les axes de priorité 1 de la filière porcine et de la thématique « qualité sanitaire des viandes et des produits carnés » et dans les axes de priorité 2 de la filière ruminant et de la filière volaille et lapins.

Les campylobactérioses sont la première zoonose bactérienne en France avec une incidence annuelle estimée à 842 cas pour 100 000 habitants. Le taux d'infection à *C. coli* en France est supérieur à celui retrouvé dans les autres pays européens. De plus, dans les différentes filières de production animale, la prévalence de *C. coli* est importante. Ainsi, dans la filière porcine, le porc charcutier, producteur essentiel des viandes porcines, est aujourd'hui identifié comme un réservoir naturel de *Campylobacter* et est principalement contaminé par l'espèce *C. coli*. Au niveau de l'abattoir, en moyenne 65,5% des individus sont excréteurs dans leurs matières fécales et 71% sont porteurs au niveau du tube digestif. La présence de la bactérie est démontrée dans de très nombreux élevages avec 69,2% à 100% des exploitations étudiées contaminées. De plus, chez le porc, le portage intestinal est quasi exclusivement lié à *C. coli*.

Dans la filière volaille, notamment poulet de chair, *Campylobacter sp* est présent à tous les stades de la chaîne avec une très forte prévalence de contamination : 70% à 100% des lots de poulets à leur arrivée à l'abattoir ; 72% à 77% de portage caecal individuel en élevage et à l'arrivée à l'abattoir ; 88% des carcasses et 76% au niveau de la distribution. Au niveau de l'abattoir, les deux espèces les plus retrouvées sont *C. jejuni* et *C. coli* avec respectivement 57,1% et 42,5% des carcasses contaminées.

Au niveau du réservoir bovin, comme dans le réservoir volaille, *C. coli* est la deuxième espèce isolée après *C. jejuni* mais avec une prévalence nettement moins importante : 3% chez les bovins adultes et 12,5% chez les veaux contre 37,3% et 98,5% pour *C. jejuni*.

Au vu de ces différentes études et afin d'orienter les politiques en matière de gestion du risque, il paraît donc essentiel de connaître la part attribuable des infections à *C. coli* aux différents réservoirs. Au niveau européen, un critère microbiologique d'hygiène (UE n°2017/1495) a été mis en place pour les carcasses de poulets de chair. Ce type de critère pourrait être élargi à d'autres filières en fonction des résultats trouvés dans les études d'attribution de source des campylobactérioses.

Ce projet permettra d'acquérir des données de séquençage des génomes entiers de cette espèce bactérienne, de déterminer des marqueurs spécifiques d'appartenance à un hôte et ainsi de mieux comprendre l'adaptation et l'évolution de la bactérie pour développer des moyens de lutte plus adaptés.

Les études d'attribution de source consistent à évaluer la contribution relative de différentes sources à l'impact global d'une maladie c'est-à-dire à déterminer pour une zoonose alimentaire la proportion de cas imputables aux différents réservoirs animaux et environnementaux. Ces études permettent d'orienter les politiques publiques en matière de prévention des risques. Il existe différentes approches pour l'attribution de sources. Dans le cas des campylobactérioses, elles peuvent être épidémiologiques ou microbiologiques et le choix de l'approche d'attribution de sources dépend de la problématique rencontrée ainsi que du type de données disponibles.

Des études d'attribution de sources des infections à *C. jejuni* ont été menées dans plusieurs pays européens dont la France en collaboration avec le CNRCH et mettent en avant l'implication des réservoirs volaille et bovin cependant peu d'études ont été menées sur l'attribution de sources de l'espèce *C. coli*.

Ainsi, l'objectif principal de ce projet est de mener une étude d'attribution de sources des infections à *C. coli* afin de déterminer l'importance réelle des différents réservoirs animaux et d'expliquer la spécificité française c'est-à-dire le taux significativement plus élevé de cas de campylobactérioses à *C. coli*, notamment, par rapport aux autres pays européens. Cependant, afin d'optimiser cette attribution de sources, l'objectif de ce projet est également de rechercher dans le génome de *C. coli* des marqueurs génétiques présentant un fort signal d'association à l'hôte.

Le CNRCH sera impliqué dans la sélection et l'obtention de génomes de *C. coli* isolés de prélèvements humains et dans les analyses bioinformatiques d'attribution de source.

Le démarrage de ce projet est soumis à l'obtention d'un financement suffisant. Le CNRCH a déjà commencé ses analyses sur les génomes de *C. coli* humains (cf paragraphe suivant).

-Projet-attribution de sources pour *C. coli*.

Le projet 2018 – 2019 pour *C. coli* consiste en la détermination génomique de marqueurs discriminants les différentes populations sources, à savoir : volailles, ruminants ou environnement. Le but étant de permettre d'établir un profil des réservoirs à l'origine des contaminations par ce pathogène en France.

Sélection des souches : Plusieurs souches seront utilisées dans l'étude. Elles ont été isolées entre 2015 et 2017 et proviennent des réseaux Campy.COM et Campy.HOP avec en particulier un nombre équivalent de souches sensibles et de souches résistantes aux antibiotiques ; un nombre de souches provenant de patients masculins équivalent à celui provenant de patients féminins ; une moyenne d'âge des patients aux alentours de 37 ans (dans chaque population, sensible et résistante). Le séquençage Illumina (HiSeq4000) par la société Integragen a été choisi pour le WGS : les 96 premiers ADN de *C. coli* ont été envoyés pour séquençage en décembre 2018.

Bilan séquençage : Les fichiers de données NGS brutes obtenus de la société Integragen (séquences Forward et Reverse) ont été traités par notre ingénieur en bioinformatique. La filtration des séquences en fonction de leur qualité a été réalisée puis les génomes ont été assemblés à l'aide de l'outil SPAdes. L'assemblage de ces 96 premiers génomes de *C. coli* à partir de données NGS a permis d'obtenir des fichiers d'une taille globale de 1.69 Mpb, composés en moyenne de 40 contigs (taille moyenne : 47kpb) ; un GC% de 31 ; en moyenne 1900 gènes annotés/génome. Parmi ces 96 génomes, seulement 7 assemblages ont donné des résultats non exploitables, avec de très nombreux contigs de petites tailles et une faible couverture.

Après assemblage des génomes de *C. coli* issus de données NGS, la détermination des marqueurs se réalisera de deux manières. D'une part via l'annotation des génomes en comparant les différentes versions d'un même gène parmi les individus, différents profils peuvent être dressés. D'autre part, par un génotypage via la détermination de SNPs en alignant les souches sur une référence des mutations peuvent être déterminées, pouvant être représentatifs d'une population donnée. La robustesse de ces marqueurs (allèle ou SNP) sera établie par l'utilisation d'outils statistiques (-tel le logiciel Structure (<https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>)).

-Identification de marqueurs génomiques des souches invasives de *Campylobacter jejuni* :

Nos travaux d'attribution de sources pour *C. jejuni* menés en 2018 ont montré que les souches invasives de *C. jejuni* provenaient majoritairement d'un réservoir volaille. Les souches séquencées lors de notre campagne de séquençage 2017/2018 ainsi que celles précédemment séquencées lors du projet mené par le LNR de Ploufragan seront utilisées pour effectuer une analyse GWAS (Genome Wide Association Study) comparant les souches invasives et non invasives. La méthode GWAS, appliquée aux bactéries, nécessite la création d'un pangénome (liste des gènes présents dans au moins une souche). Plusieurs méthodes de GWAS sont envisagées et seront testées afin d'identifier d'éventuels marqueurs d'invasivité. Les gènes ainsi mis en évidence seront ensuite étudiés afin de mieux comprendre les mécanismes d'invasivité chez *Campylobacter jejuni*.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1.-Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Le CNR *Campylobacter* et *Helicobacter* s'est engagé à assurer les missions définies par le décret no 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles. Il nous est en outre particulièrement demandé d'assurer les missions suivantes :

Pour *Campylobacter sp*

Expertise

- en développant et en améliorant les techniques de typage moléculaire ;
- en participant à la standardisation des méthodes diagnostiques et de typage par l'implication dans un réseau d'expertise et de surveillance internationale ;
- en identifiant et en typant les souches ;
- en testant la sensibilité des souches de *Campylobacter* et *Helicobacter* aux antibiotiques, en lien avec le CNR des résistances aux antibiotiques ;
- en contribuant au suivi de l'évolution de la résistance aux antibiotiques ;
- en contribuant à l'élaboration de recommandations concernant les techniques d'isolement et de typage ;
- en contribuant à la formation du personnel des laboratoires de biologie médicale de ville et hospitaliers ;
- en collaborant avec les organismes nationaux compétents dans le domaine de *Campylobacter* chez l'animal, et notamment le LNR *Campylobacter*.

Conseil

- aux biologistes et cliniciens.

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

- en constituant et maintenant un réseau de laboratoires permettant de fournir pour chaque espèce, des données sur l'évolution et les caractéristiques des cas ;
- en contribuant à l'investigation de cas groupés par l'identification et la comparaison des souches isolées chez l'homme et dans le véhicule suspecté à l'origine des cas groupés ;
- en collaborant aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.

Contribution à l'alerte

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

Pour *Helicobacter pylori*

Expertise

- en identifiant et en caractérisant les souches, notamment en terme de résistance aux antibiotiques ;
- en développant, évaluant et/ou aidant à la diffusion des techniques diagnostiques.

Conseil

- aux biologistes et cliniciens.

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

- en surveillant la résistance aux antibiotiques des souches.

Contribution à l'alerte

1.2.-Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

La responsabilité scientifique du CNR Campylobacters et Hélicobacters est portée par le Pr Philippe Lehours. La gestion administrative du CNR est effectuée par le CHU de Bordeaux (pôle de Biologie et Pathologie, Mr David Karle). Notre CNR assure l'ensemble des missions citées ci-dessus sans laboratoire associé.

Organigramme 2017-2021 actualisé au 1^{er} avril 2019

Fonction	Nom	Qualification	Statut
Responsable scientifique	Philippe Lehours	Ph., Dr. ès Sci	PU-PH
Responsable adjoint	Francis Mégraud	Ph., Dr Med	Pr Emérite, vacataire
Responsable adjoint	Emilie Bessède	Ph., Dr. ès Sci	MCU-PH
Ingénieur (IH)	Lucie Bénéjat	M2	CDD
Ingénieur (IH)	Quentin Jehanne	Master bio-info	CDD
Technicienne	Astrid Ducournau	BTS	CDD
Technicienne	Alice Buissonnière	BTS	CDD (80%)
Technicienne qualité	Mélanie Lecoeur	BTS	CDI (50%)
Technicienne	X (pool des techniciens du laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin)	BTS	CDI
Secrétaire	Erick Keisler	BTS	CDD (60%)

IH : ingénieur hospitalier ; Personnel recruté en 2018.

Courant 2018, un technicien qualité a été recruté à 50% pour initier la démarche qualité du CNRCH. Ce technicien qualité a également été recruté à 50% par le CNR IST (Pr C Bébéar).

1.3.-Locaux et équipements

Les locaux principaux du CNR (Laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin) sont composés de deux pièces techniques principales et du bureau du Pr F Mégraud (Figure 14), soit une surface totale proche de 70 m² dont les 2/3 sont destinées aux activités techniques.

S'y ajoutent une pièce contenant 6 congélateurs à -80°C à la disposition du CNR, l'utilisation de la laverie, de la pièce de préparation des milieux et l'accès à de nombreuses plateformes techniques, de l'hôpital (spectrométrie de masse MALDI-TOF, SIRscan, PCR en temps réel, séquençage) mais aussi de l'Université (protéomique, imagerie, animalerie A2). Les locaux de l'Unité INSERM U853 devenue au 1^{er} Janvier 2016 l'équipe 2 de l'U1053 UMR BaRITOn, à laquelle ce CNR est adossé, sont également utilisés par le personnel du Centre. Ils sont situés sur le site de l'Université (site de Carreire, Bat 2B, RDC, Zone Nord) à moins de 100 mètres du laboratoire hospitalier principal.

Les principaux équipements au niveau du laboratoire principal du CNR sont constitués de :

- une enceinte microaérobique Concept-M400 (Ruskinn Technology Ltd.) remplacée en 2017 ;
- un appareil Anoxomat (MART) et des jarres adaptées ;
- un automate d'extraction d'ADN Arrow (NorDiag) ;
- un PSM (Gelaine) ;
- une étuve à 35°C ;

- un réfrigérateur-congélateur ;
- cinq ordinateurs connectés aux SIL et au réseau du CHU de Bordeaux ;
- un photocopieur/imprimante/scan/fax acheté en 2018 ;
- 6 congélateurs à -80°C (New Brunswick Scientific) avec deux systèmes de surveillance de la température :

Waranet-Solution relié à un ordinateur dédié, et Sirius géré par le CHU de Bordeaux.

Au niveau du laboratoire INSERM U1053, nous disposons de 3 thermocycleurs (2 thermocycleurs Eppendorf 25 puits, 1 thermocycleur Eppendorf de 96 puits), d'un spectromètre de masse isotopique pour l'analyse des tests respiratoires à l'urée marquée au ^{13}C , d'un lecteur multifonction (dosages acides nucléiques en microplaque, lecteur de plaque type ELISA). Nous avons accès à la plateforme de biologie moléculaire du CHU et à celle de la FR Transbiomed (Université de Bordeaux) pour réaliser nos PCR en temps réel.

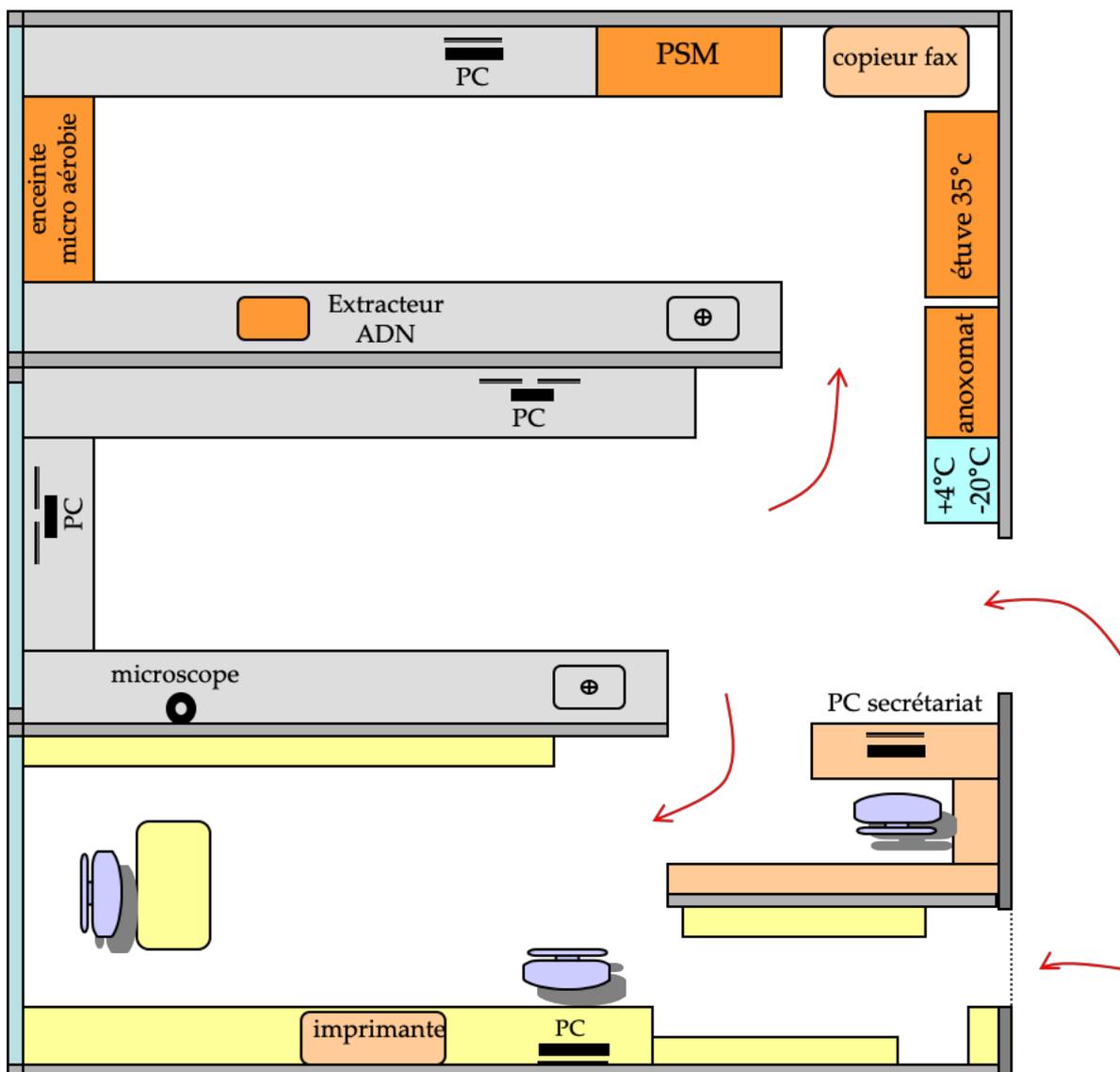


Figure 14 : Plan simplifié des locaux du CNRCH.

1.4.-Collections de matériel biologique

Le CNR conserve l'intégralité des isolats de *Campylobacters* et bactéries apparentées (*Arcobacters*, *Hélicobacters* entérohépatiques) de 2013 à 2018 (environ 5000 souches/année). Nous disposons également de l'intégralité des souches de *H. pylori* (n=5000 environ, depuis 1983).

Nous avons en 2018 transféré 1867 souches de *Campylobacter sp* des années 2002 à 2012 vers le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Bordeaux (CRB). Nous avons décidé de transférer en priorité toutes les souches invasives (isolées de flacon d'hémoculture, liquide articulaire, LCR, etc...), toutes les espèces rares autres que *C.*

jejuni et *C. coli* et les isolats de *C. jejuni* et *C. coli* provenant de sites d'isolement plus inhabituels (ex : biopsies digestives, placenta et vésicule biliaire).

Le CNR dispose d'une collection de souches types pour de nombreuses espèces du genre *Campylobacter sp* (n=13), *Arcobacter sp* (n=3) ou *Helicobacter sp* (n=18) (cf paragraphe 2.4). Ces souches peuvent être envoyées aux laboratoires sur demande en France ou pour des laboratoires étrangers (Européen essentiellement). L'ADN sur demande peut également être envoyé.

Un projet de convention est toujours en attente de validation par le CHU de Bordeaux pour le transfert annuel année par année (transfert des souches de 2013 en 2018, puis de 2014 en 2019, etc...) des souches invasives (isolées de flacon d'hémoculture, liquide articulaire, LCR, etc...) et des espèces rares autres que *C. jejuni* et *C. coli*. L'objectif étant de sanctuariser nos collections, et de disposer en permanence de l'intégralité de notre collection afin de répondre aux demandes de collaborateurs nationaux (notamment le LNR *Campylobacter* de Ploufragan) et internationaux.

1.5.-Démarche qualité du laboratoire

Les prélèvements sont traités pour la culture au niveau du laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Pellegrin. Il fait partie du Pôle de Biologie et Pathologie qui a initié fin 2008 une demande d'accréditation COFRAC ISO 15189.

Durant l'année 2018, nous avons poursuivi nos efforts pour avancer dans notre démarche d'accréditation. Les documents ont été mis à jour et des fiches de poste préparées.

Nous avons aussi organisé un contrôle de qualité pour le diagnostic de *H. pylori* avec le laboratoire de référence pour la résistance aux antibiotiques de *H. pylori* du CHU NAMUR-Belgique (Y. Glupczynski), et au Portugal (M. Oleastro) de type « ring test ». Nous avons participé à l'EEQ Européen organisé par le Statens Serum Institute, Danemark pour les *Campylobacters*. Nous avons participé en septembre 2018 à un EEQ du Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD, <https://www.qcmd.org/index.php?pagelid=3&pageVersion=EN>) pour les PCR *H. pylori*.

Le recrutement d'un technicien qualité en 2018 a permis au CNR de rentrer concrètement dans la démarche d'accréditation de ses activités.

Un audit interne qualité est programmé en octobre 2019.

Afin de préparer au mieux cet audit, nous avons remis à jour l'organigramme fonctionnel et créé la matrice des compétences des biologistes, des techniciens de laboratoire et des ingénieurs.

Des fiches de fonction décrivant les responsabilités, les autorités et les tâches de l'ensemble du personnel ont été mises en place.

Des matrice de compétences en découlent des fiches de postes par paillasse où sont indiquées les qualifications du personnel pour ce poste. Ces qualifications reflètent la formation, l'expérience et les compétences nécessaires pour les tâches à réaliser.

Des fiches de tutorat ont été créés afin d'assurer la formation au poste de travail sous supervision d'un sénior. Le CNRCH va évaluer la compétence de chaque personne à réaliser les tâches attribuées conformément aux critères établis sur des fiches d'habilitation.

Les documents décrivant les processus Pré-analytique, Analytique et Post-analytique ont été intégrés dans le logiciel Sharepoint du CHU de Bordeaux, pour y être gérés et consultés par l'ensemble du personnel du CNRCH.

Au cours de l'année 2019, les habilitations de l'ensemble du personnel du CNR seront programmées et une fois terminées, nous poursuivrons nos démarches par les dossiers de validation de méthode des analyses à accréditer.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1.-Liste des techniques de référence

Les éléments surlignés en gris correspondent à ceux que nous souhaitons accréditer dès que possible.

Pour *Campylobacters* et bactéries apparentées (*Arcobacters*), les techniques disponibles sont :

- culture, identification standard et par galerie Api Campy ;
- antibiogramme standard par diffusion et détermination des CMI par Etest ou par dilution en milieu gélosé ;
- PCR standard pour *C. jejuni* et *C. coli* ;
- PCR en temps réel pour *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus* ciblant le gène *gyrA* ainsi que pour *A. butzleri* et *A. cryaerophilus* ;
- séquençage de l'ARNr 16S pour identification ;
- PCR en temps réel pour la recherche des mutations à l'origine de la résistance des *Campylobacters* aux macrolides à partir de souches ou de selles ;
- identification au niveau de l'espèce par spectrométrie de masse MALDI-TOF (E. Bessède *et al.* 2011).
- étude de marqueurs épidémiologiques de typage par RAPD, par MLST ou par séquençage de génome (NGS) ;
- recherche d'antigènes de *Campylobacter sp* dans des prélèvements de selles : tests immunochromatographiques rapides ou test ELISA.
- sérologie *Campylobacter jejuni* par réaction de fixation du complément.

Pour *H. pylori*, les techniques disponibles sont :

- culture sur milieu gélosé et identification phénotypique standard ;
- PCR en temps réel basée sur le gène de l'ARNr 23S pour détecter *H. pylori* et les mutations à l'origine de la résistance à la clarithromycine selon la technologie développée au laboratoire (Oleastro *et al.* 2003). La détection de ces mutations est également disponible si besoin, à l'aide de PCR temps réel commerciales ;
- antibiogramme de *H. pylori* ;
- PCR en point final (puis séquençage) de détection des mutations associées aux résistances aux fluoroquinolones (QRDR du gène *gyrA*), amoxicilline (*pbp1*) et rifamycines (*rpoB*) ;
- détection par PCR en temps réel des mutations au niveau de la boucle V de l'ADNr 16S associées aux résistances à la tétracycline ;
- PCR en point final de détection des principaux facteurs de virulence de *H. pylori* (*cagA*, génotypes de *vacA*, etc..) ;
- PCR en point final puis séquençage de l'ADNr 16S pour le genre *Helicobacter*, idem pour les gènes *gyrA* et *hsp60* dans un but phylogénétique ;
- spectrométrie de masse isotopique pour déterminer le ratio ¹³C/¹²C dans l'air expiré lors du test respiratoire à l'urée marquée au ¹³C ;
- sérologie par ELISA (BioElisa, Biokit, Barcelone, Espagne puis Enzygnost Anti *Helicobacter pylori* II-IgG, commercialisé par Diasorin) et Immunoblot (Helicoblot 2-1, Genelabs, Singapour).
- recherche d'antigènes de *H. pylori* dans des prélèvements de selles : tests immunochromatographiques rapides ou test ELISA (AO interne au CHU en cours pour le choix du fournisseur).

2.2.-Liste des techniques recommandées par le CNR

- Techniques recommandées pour la recherche d'infection à *Campylobacter sp*

La détection des *Campylobacter sp* fait partie des bactéries à rechercher systématiquement au cours des diarrhées infectieuses de plus de 48 h au même titre que la détection de Salmonelles car la fréquence des *Campylobacter spp.*, à l'origine d'infection intestinale, excède celles des Salmonelles dans notre pays.

Elle est donc indiquée notamment dans le cas de diarrhée aiguë sévère (hémorragique, syndrome dysentérique) ou rebelle (persistant plus de trois jours), aux âges extrêmes de la vie, en cas de terrain fragile, au retour d'un voyage en pays tropical et en cas de toxi-infection alimentaire collective.

La recherche des *Campylobacter sp* est le plus souvent réalisée à partir de selles ou d'hémocultures. D'autres prélèvements peuvent éventuellement permettre la culture de ces bactéries (liquides biologiques, biopsies) de manière fortuite ou orientée par l'examen microscopique.

Méthodes directes

-Coproculture :

Du fait de la fragilité des *Campylobacter sp*, les selles doivent être acheminées en moins de 2h au laboratoire ou conservées dans un milieu de transport de type Cary-Blair modifié avec de l'agar à une température comprise entre + 2°C et + 8°C.

La culture est effectuée sur un milieu riche, sélectif et qui absorbe les radicaux oxygénés libres toxiques : milieu au sang (Skirrow, Butzler, par exemple) ou au charbon (Karmali, par exemple). Des milieux commerciaux existent, chromogènes ou non.

Bien que les *Campylobacter* thermotolérants (*C. jejuni* et *C. coli* notamment) aient une température optimale de culture à 42°C, il est recommandé d'incuber les boîtes à environ 35°C. Ceci est extrêmement important car, d'une part, cette température n'a pas de conséquence négative sur la culture de *C. jejuni* et *C. coli* (les 2 principales espèces isolées) et, d'autre part, elle permet la culture de *C. fetus*, de *Arcobacter sp* et d'autres espèces de *Campylobacter sp* plus rares.

L'incubation est réalisée impérativement en atmosphère microaérobie et les géloses doivent être incubées immédiatement après ensemencement. Les cultures sont observées après 24h, 48h et 72h d'incubation.

Les colonies de *Campylobacter* sont petites, lisses, luisantes, souvent étalées ou en nappe. L'identification au niveau du genre peut être faite sur la morphologie incurvée ou spiralée au microscope et sur la présence d'une oxydase.

L'identification au niveau de l'espèce a été historiquement réalisée à l'aide de tests phénotypiques simples (hydrolyse de l'hippurate pour *C. jejuni* par exemple). Cependant, ces tests ont perdu de leur intérêt depuis la généralisation de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires. L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF est particulièrement performante pour l'identification des *Campylobacter* et permet d'identifier des genres et espèces difficilement accessibles par les tests d'identification conventionnels, notamment : *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, les *Campylobacter* «anaérobies» (*Campylobacter ureolyticus* notamment), les *Arcobacter* et les *Helicobacter* entérohépatiques dont pour certains la pathogénie est proche des *Campylobacter* (notamment *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter cinaedi*). L'identification systématique par spectrométrie de masse, méthode rapide et peu coûteuse, de plusieurs colonies (y compris d'aspect atypique) poussant sur les milieux sélectifs augmente le taux de détection.

-Recherche dans les selles par méthode moléculaire ou immuno-enzymatique :

Des tests ELISA et des tests immuno-enzymatiques rapides sont maintenant commercialisés pour la détection de *Campylobacter sp* dans les selles. Les tests ELISA disponibles sur le marché ont une bonne concordance avec la PCR en temps réel, sont plus sensibles que la culture tout en ayant une bonne spécificité. Leur inconvénient est d'être limité à la seule recherche de *C. jejuni* et *C. coli* et non des autres *Campylobacter sp* et des bactéries apparentées. Aussi, les tests ELISA commercialisés ont été recommandés pour la recherche de *Campylobacter sp* lors des tests réalisés en vue d'une transplantation fécale. Les tests rapides immuno-enzymatiques ont également une bonne sensibilité et spécificité (5 à 20% de tests isolément positifs par rapport à la culture). Ils pourraient être utilisés en routine comme tests de dépistage avant culture. Ces tests cependant sont à réserver à des populations cibles à forte prévalence potentielle d'infection à *Campylobacter* : diarrhées communautaires aiguës fébriles.

La recherche par amplification génique est maintenant commercialisée dans des trousseaux multiplexés permettant la détection de nombreux entéro-pathogènes dont *C. jejuni* et *C. coli*. Ce type d'approche commence à être réalisé en routine dans certains laboratoires équipés notamment d'appareil de PCR multiplex syndromiques. L'extraction de l'ADN ne pose en général pas de problème car la charge bactérienne en *Campylobacter spp.* est importante, à condition d'utiliser un kit d'extraction adapté à l'élimination d'inhibiteurs de PCR souvent présents dans les selles. La PCR en temps réel est plus sensible que la culture et permet d'obtenir des résultats rapides. Les tests multiplexés permettent maintenant une stratégie de tri rapide des selles positives. Une interprétation clinico-biologique des résultats peut être réalisée après évaluation des performances de ces tests avec celle de la culture. Aucun test à ce jour n'inclut cependant la détection de *C. fetus* et des *Arcobacter*.

-Hémocultures et autres prélèvements :

L'utilisation de flacons d'hémoculture utilisant des systèmes de détection automatiques de la croissance bactérienne a permis d'améliorer la détection des bactériémies à *Campylobacter sp*. Les flacons dont l'examen microscopique évoque la morphologie de *Campylobacter spp.* doivent être repiqués en atmosphère microaérobie.

En dehors des épisodes digestifs, les infections systémiques à *Campylobacter sp* surviennent surtout chez les personnes âgées ou fragiles. Elles sont à l'origine d'une mortalité importante (15%) notamment celles à *C. fetus*.

Méthode indirecte

Le sérodiagnostic n'a d'intérêt qu'en cas de pathologie post-infectieuse de type arthrite ou syndrome de Guillain-Barré. Il peut se faire par ELISA (dosage des IgG et IgM) ou par réaction de fixation du complément (des tests commerciaux sont disponibles).

Antibiogramme des Campylobacters

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les critères proposés par le CA-SFM et harmonisés en fonction des critères proposés par l'EUCAST (CA-SFM/EUCAST 2018) :

-milieu MH-F : Mueller-Hinton + 5% sang de cheval défibriné et 20 mg/L de β -NAD ;

-inoculum : 0,5 McFarland ;

-incubation : atmosphère microaérobie, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 24h. Si la culture est insuffisante après 24h, réincuber immédiatement et effectuer une lecture après 40-48h d'incubation ;

-lecture : mesurer les diamètres d'inhibition directement face à la boîte, couvercle retiré, éclairée par une lumière réfléchie. Ne pas tenir compte des images « fantômes » au sein des zones d'inhibition ;

-contrôle de qualité : *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.

La résistance aux macrolides reste limitée, celle à l'amoxicilline-acide clavulanique ainsi qu'à la gentamicine est exceptionnelle.

Toute résistance observée à l'amoxicilline-acide clavulanique doit être vérifiée, d'une part, en vérifiant l'identification du genre et de l'espèce (confusion possible avec *Arcobacter sp*) et, d'autre part, en testant la sensibilité sur un autre lot de disques ou, à défaut, par bandelettes à gradient de concentration.

Des valeurs limites spécifiques (diamètre et CMI) doivent être utilisées pour déterminer la sensibilité de *C. fetus* aux fluoroquinolones, celles pour *Arcobacter sp* ne sont pas encore disponibles. Pour les *Arcobacters* les « cut-offs » utilisés pour les Entérobactéries sont recommandés pour catégoriser la sensibilité à l'ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, ciprofloxacine et gentamicine. Les macrolides et les tétracyclines ne sont plus catégorisés.

Les valeurs critiques sont indiquées dans les recommandations du CA-SFM.

-Techniques recommandées pour le diagnostic d'infection à *H. pylori*

Ces méthodes sont classées en « invasives » ou « non invasives », selon qu'elles nécessitent ou non des biopsies de la muqueuse gastrique antrale et fundique pratiquées au cours d'une fibroscopie gastro-duodénale.

Méthodes invasives

Ce sont les méthodes les plus sensibles et spécifiques. L'association des examens histologiques et des techniques bactériologiques (détection moléculaire ou culture) permet d'une part le dépistage des lésions pré-néoplasiques (atrophie, métaplasie, dysplasie) et néoplasiques (cancer, lymphome) et d'autre part la détection spécifique de la bactérie et la détermination de son profil de résistance aux principaux antibiotiques.

-Test rapide à l'uréase

Cette méthode est adaptée à une recherche rapide en salle d'endoscopie dès les biopsies effectuées. La forte activité uréasique de *H. pylori* est détectée en plaçant un fragment biopsique dans le milieu réactionnel d'une trousse commerciale *ad hoc*. La lecture doit être effectuée en 1h. Sa sensibilité est de 80%, sa spécificité de 95%. Ce test est réalisé sous la responsabilité de l'endoscopiste et à sa charge. Le principal intérêt de ce test est de permettre la mise en œuvre immédiate d'un traitement probabiliste en cas de résultat positif. Il n'est pas inscrit à la NABM.

-Examen anatomo-pathologique

C'est la méthode de détection la plus répandue. La fixation des biopsies par le formol assure une conservation et un transport simple et pratique vers le laboratoire d'anatomopathologie. La qualité des biopsies obtenues, leur nombre (5 sont recommandées) et l'expertise de l'examineur conditionnent les performances de cet examen. Sa valeur ajoutée est de visualiser la gastrite associée à l'infection et les lésions ou complications associées (atrophie, métaplasie, dysplasie, cancer, lymphome), et de classer la gastrite selon le score de Sydney (systèmes OLGA et OLGIM). L'autre avantage est de permettre la visualisation, de par leur morphologie caractéristique, de bactéries du genre *Helicobacter* rattachées au groupe *heilmannii* comportant des espèces non ou très difficilement cultivables.

-Examen bactériologique standard

Prélèvement, transport

Au cours de l'endoscopie gastrique, plusieurs biopsies sont prélevées dans l'antré à environ 3 cm du pylore et au niveau du tiers supérieur du fundus. Les échantillons doivent être adressés rapidement au laboratoire en utilisant un milieu de transport spécifique à +4°C (milieu Portagerm Pylori, BioMérieux) : le délai de transport doit être idéalement de 24h. Une autre solution est de congeler les biopsies immédiatement dans un tube sec et les acheminer en carboglace ou en azote liquide.

Broyage des biopsies

Il est conseillé de broyer les biopsies avec du matériel jetable (micro tube + pilon) dans un bouillon nutritif.

Examen microscopique

Le produit de broyage est étalé en frottis sur une lame colorée par la méthode de Gram. *H. pylori* apparaît comme un bacille incurvé, ou spiralé à Gram négatif. La sensibilité de l'examen microscopique est de 75%.

Mise en culture

C'est la méthode la plus spécifique. Elle permet de déterminer la sensibilité de la bactérie isolée aux antibiotiques. Sa sensibilité peut atteindre 95% si les étapes de la phase pré-analytique sont optimales. Ses inconvénients sont liés aux exigences du transport des biopsies au laboratoire et au délai prolongé de réponse car cette bactérie a une croissance lente.

Le produit de broyage estensemencé sur un milieu constitué d'une base gélosée (milieux cœur-cerveau, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Brucella, par exemple) additionnée de 10% de sang (mouton, cheval ou humain). Des suppléments sélectifs sont utilisés pour inhiber la croissance de contaminants occasionnels. Une gélose prête à l'emploi est commercialisée par bioMérieux, elle présente une bonne sensibilité et une bonne sélectivité.

L'incubation est réalisée rapidement en atmosphère microaérobie, humide, à environ 35°C +/- 2°C. En primoculture, les colonies n'apparaissent pas avant 3 jours. Les primocultures doivent être incubées 10-12 jours avant d'être déclarées négatives. Dès l'apparition d'une pousse bactérienne, les colonies doivent être repiquées afin d'éviter l'apparition rapide de formes coccoïdes non subcultivables.

L'identification à l'espèce est facile sur les critères d'exigence culturelle (microaérobie), l'aspect incurvé ou spiralé au Gram et la présence d'une activité uréasique, oxydasique et catalasique. La spectrométrie de masse MALDI-TOF utilisant les bases de données commerciales ne permet pas l'identification de *H. pylori* du fait de la grande diversité des souches rencontrées.

Selon les recommandations HAS de 2017, la gastroscopie avec envoi des biopsies pour examen histopathologique et culture (+/-PCR) est recommandée en première intention pour les patients avec symptômes orientant vers une pathologie digestive haute notamment :

- syndrome ulcéreux ;
- dyspepsie chez un patient > 40-45 ans et/ou en cas de symptômes d'alarme (dont dysphagie, amaigrissement, anémie) ;
- anémie ferriprive ou carence en vitamine B12 sans cause trouvée ;
- patients avec facteurs de risque de cancer gastrique : personnes > 40-45 ans, apparentées à un patient ayant eu un cancer gastrique ;
- autres facteurs de risque : lymphome gastrique du MALT ;
- intervention bariatrique prévue.

Détection moléculaire

La PCR en temps réel permet de façon beaucoup plus rapide que la culture la détection spécifique de *H. pylori* à partir des biopsies gastriques. Des troupes diagnostiques commercialisées et performantes, sont disponibles et donnent un résultat en 2 à 4h. La sensibilité est supérieure à celle de la culture. L'automatisation de l'extraction en facilite la réalisation. Ces troupes renseignent toutes sur la présence de l'infection et des mutations associées à la résistance aux macrolides.

Une troupe utilisant une PCR multiplex suivie d'une hybridation sur bandelette est aussi disponible et permet la recherche des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones en plus des macrolides.

La détection de *H. pylori* par PCR n'est pas encore inscrit à la NABM.

Méthodes non invasives

-Test respiratoire à l'urée marquée

Ce test est basé sur l'activité uréasique de *H. pylori*. Il détecte la production de CO₂ marqué au carbone 13 à partir d'urée ¹³C ingérée par le patient. Le test doit être réalisé à jeun, avant tout traitement ou au moins 4 semaines après la fin d'un traitement antibiotique et à 2 semaines de l'arrêt des inhibiteurs de la pompe à proton. Le ¹³CO₂ est détecté dans l'air expiré, juste avant et 30 min après l'ingestion de l'urée marquée, par spectrométrie de masse ou infrarouge. Les prélèvements sont adressés aux laboratoires équipés sans conditions particulières de transport. La sensibilité et la spécificité de ce test dépassent 95%. Il est particulièrement recommandé pour le contrôle de l'efficacité du traitement d'éradication. Le ¹³C étant un isotope naturel non radioactif, ce test peut être réalisé sans danger chez l'enfant et les femmes enceintes.

-Sérologie

De nombreuses trousse diagnostiques utilisant les techniques ELISA ou Western-blot sont commercialisées mais seulement 4 ont une sensibilité et une spécificité supérieures à 90% selon une étude de l'ANSM (ex-AFSSAPS) et sont donc recommandées. A l'opposé, les tests de diagnostic rapide immuno-chromatographiques et ceux utilisant de la salive ou des urines ne sont pas recommandés du fait de leurs performances médiocres. La sérologie est peu coûteuse et de réalisation facile. Elle est recommandée comme test diagnostique en cas d'ulcère hémorragique, d'utilisation récente d'inhibiteur de la pompe à protons (IPP), d'antibiotiques ou en cas de charge bactérienne faible (atrophie gastrique et lymphome du MALT) car les autres tests peuvent être faussement négatifs. Cependant elle ne permet pas de distinguer une infection active d'une infection ancienne à cause de la persistance fréquente des anticorps après un traitement antibiotique efficace. Elle n'est donc pas utilisée pour le contrôle d'éradication. L'HAS recommande la sérologie comme test diagnostique de première intention dans les cas suivants :

Personnes ou patients sans symptôme digestif :

-< 40-45 ans, apparentés à un patient ayant eu un cancer gastrique ;

-ou avec antécédent d'ulcère sans preuve d'éradication de *H. pylori* (y compris avant prise d'AINS ou d'aspirine à faible dose) ;

-ou avec purpura thrombopénique immunologique.

En cas de positivité, il est recommandé de pratiquer une endoscopie avec envoi de biopsies pour culture et PCR.

-Recherche de *H. pylori* dans les selles

H. pylori est éliminé dans les selles sous forme non viable, ce qui rend possible la détection de son ADN par amplification génique. La limite de cette recherche est la présence d'inhibiteurs de la *Taq* polymérase dans les échantillons. Des formats de PCR adaptés aux selles commencent à être commercialisés et permettent la détection à la fois de la bactérie et des mutations associées à la résistance aux macrolides.

Une autre méthode de recherche est la détection d'antigènes spécifiques de cette bactérie par technique ELISA ou immuno-chromatographique dans les selles. Les tests utilisant des anticorps monoclonaux doivent être utilisés. La sensibilité et la spécificité de ces tests sont légèrement inférieures à celles du test respiratoire à l'urée marquée. Ils sont donc recommandés pour le contrôle d'éradication quand le test respiratoire n'est pas disponible ou peu praticable (enfants).

Ces tests ne sont pas inscrits à la NABM.

-Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les critères proposés par le CA-SFM et harmonisés en fonction des critères proposés par l'EUCAST (CA-SFM/EUCAST 2018) :

-milieu MH-10% sang de mouton ou milieu MH-F ou gélose Schaedler vit K1 ;

-inoculum : 3 McFarland ;

-incubation : atmosphère microaérobie, 35°C, 48h. Si la culture est insuffisante après 48h, réincuber immédiatement et effectuer une lecture après 72h d'incubation ;

-lecture : mesurer les CMI à l'intersection de l'ellipse d'inhibition avec la bandelette de E-test. Ne pas tenir compte des images « fantômes » au sein des zones d'inhibition ;

-contrôle de qualité : *Helicobacter pylori* CCUG 17874.

Selon les recommandations du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, du CNR *Helicobacter* et du CA-SFM, les antibiotiques qui doivent être testés (en CMI uniquement) sont la clarithromycine et la lévofloxacine. Il n'est pas nécessaire de tester l'amoxicilline car cette résistance est rare, ni le métronidazole du fait du manque de reproductibilité

des résultats de CMI et de sa signification clinique limitée. La sensibilité à la tétracycline et aux rifamycines peut être testée en seconde intention bien que les résistances soient rares.
Les valeurs critiques sont indiquées dans les recommandations du CA-SFM.

Statistiques de fréquentation du site internet du CNR Campylobacters-Hélicobacters (www.cnrch.fr)

-Fréquentation 2018

Sur l'année 2018, le site a accueilli environ 3487 visiteurs qui ont vu plus de 12 533 pages (contre 2855 visiteurs et 5436 pages vues en 2017). Soit une augmentation de 18 % de visiteurs et 130 % de pages visitées, retrouvant le niveau de 2016.

La durée moyenne de visite est d'environ 1 minute 34 pour environ 2,20 pages vues.

Les pages les plus consultées sont :

- accueil 29,62 %
- envoi prélèvement 24,06 %
- centre national de référence des campylobacters et hélicobacters 10,66 %
- actualités du CNRCH 10,36 %
- autres informations 6,13 %
- contact 5,97%
- bilans 3,85 %
- publications cnrch 3,50 %
- les CNR 2,72 %.

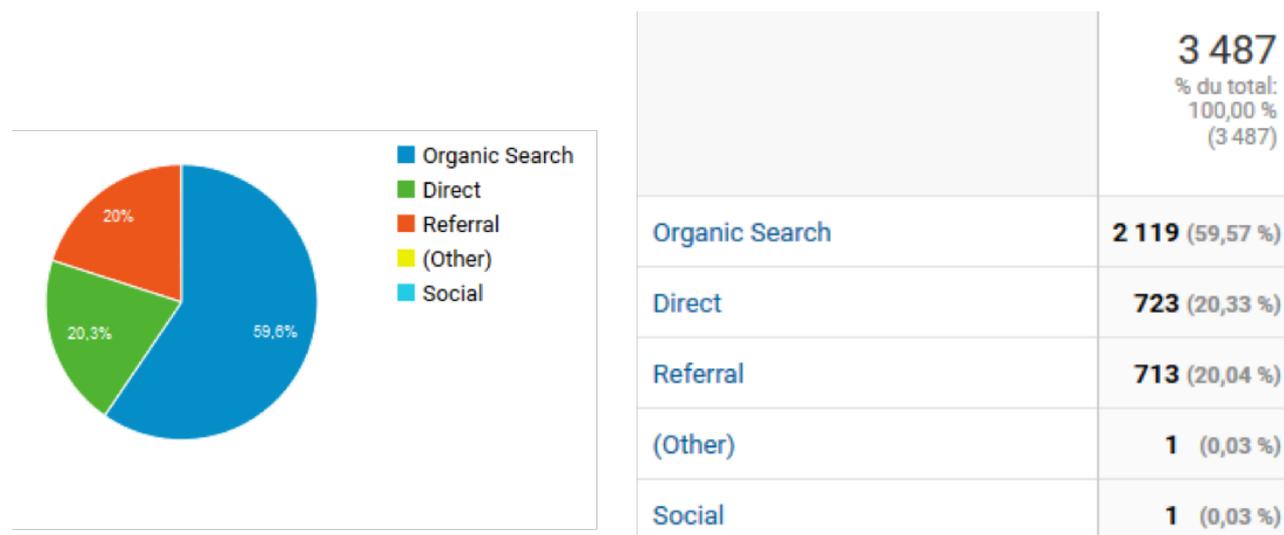
-Bilan de la fréquentation 2006-2018

De 2006 à 2018, le site a accueilli environ 45282 visiteurs uniques qui ont visités plus de 122 187 pages.

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Visiteurs	4281	4633	4548	3897	4078	3426	2811	2333	2178	2837	3918	2855	3487
Pages vues	9806	10828	10964	9188	10255	9923	8893	7983	7157	8400	10821	5436	12533

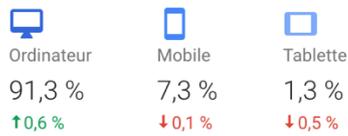
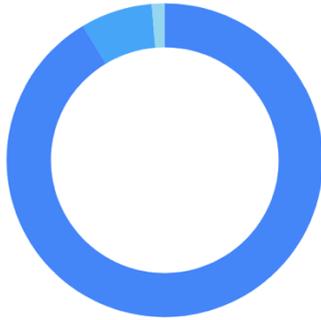
-Affluents

59,60 % de nos visiteurs sont venus par l'intermédiaire des moteurs de recherche contre 60,40% l'année précédente, 20,30 % par accès direct et 20,00 % par un lien externe.



-Equipements

La majorité de nos utilisateurs ont utilisé leur ordinateur personnel (91,3% des connexions en 2018).



-Géolocalisation

La majorité des visiteurs proviennent de France 74%, suivi par les Etats-Unis 9%, les pays d'Europe 5,76%, l'Afrique 6,61%, la Corée du Sud 1,66%, le Canada 1,46% et autres 1,51%.

