



HAL
open science

Épidémiologie de le diphtérie en Nouvelle-Calédonie

Ève Clara Andréa Tessier

► **To cite this version:**

Ève Clara Andréa Tessier. Épidémiologie de le diphtérie en Nouvelle-Calédonie. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03468563

HAL Id: dumas-03468563

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03468563>

Submitted on 7 Dec 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021

Thèse n° 133

THÈSE POUR L'OBTENTION DU

DIPLÔME D'ÉTAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par TESSIER, Ève, Clara, Andréa

Née le 08/12/1991 à Saint Sébastien sur Loire

Le 26 novembre 2021

Épidémiologie de la diphtérie en Nouvelle-Calédonie

Étude des souches isolées en Nouvelle-Calédonie : épidémiologie, aspects cliniques rétrospectifs, étude de l'antibiorésistance et apports de la génomique et de la phylogénétique.

Sous la direction de : Julien COLOT

Membres du jury :

Madame la Professeure DUBOIS, Véronique

Monsieur le Professeur CAZANAVE, Charles

Monsieur le Docteur SALIOU, Philippe

Madame la Doctoresse MERLET, Audrey

Monsieur le Docteur COLOT, Julien

Présidente

Examinateur

Examinateur

Examinatrice

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A la présidente du jury

Madame la Professeure DUBOIS Véronique,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et d'évaluer mon travail, je vous en suis sincèrement reconnaissante.

Aux membres du jury

Monsieur le professeur CAZANAVE Charles.

Vous avez accepté de faire partie de mon jury, recevez ici toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Monsieur le Docteur SALIOU Philippe,

Je vous suis très reconnaissante de bien vouloir juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Madame la Doctoresse MERLET Audrey,

C'était un plaisir de travailler avec toi en Nouvelle-Calédonie, je suis heureuse et honorée de te compter aujourd'hui parmi les membres de mon jury.

Au directeur de thèse

Monsieur le Docteur COLOT Julien

Merci de ta disponibilité tout au long de ces 13 mois de stage, tu m'as réellement formée en plus de toutes les responsabilités qui t'incombent dans tes journées toujours trop remplies, je t'en serai toujours reconnaissante. Merci également d'avoir eu la patience d'encadrer ce travail, je suis heureuse d'avoir pu le réaliser sous ta direction.

Aux personnes rencontrées en Nouvelle-Calédonie :

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire du CHT, techniciennes, infirmières hygiénistes, biologistes. Vous m'avez accueillie et fait découvrir aussi bien le laboratoire que la Nouvelle-Calédonie. J'aimerais en particulier remercier Nathalie, Antoine, Marie-Amélie, Julien, Ann-Claire, Madeline : j'ai appris à vous connaître et chacun de vous m'a apporté quelque chose de différent, sur le plan professionnel et personnel. Vous avez tous réussi à allier compétence et qualités humaines et resterez pour cela des modèles pour moi.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je n'y incluais pas les médecins du CHT auprès desquels j'ai énormément appris, en particulier en réanimation, en orthopédie et surtout en médecine interne/infectiologie. Cécile, Audrey, Karine, Claire, Jad. J'ai également une pensée toute particulière pour Elodie Descloux.

Merci enfin aux personnes merveilleuses que j'ai rencontrées sur le caillou :

Océane, Solène, Pierre, Julien, David.

Merci à l'ensemble des personnes qui m'ont accompagnée tout au long de mes études :

Aux secrétaires de la faculté de Bordeaux qui m'ont aidée dans mes demandes d'interCHU et de thèse les 4 dernières années.

À l'ensemble de l'équipe du laboratoire Reseubio avec qui j'ai collaboré cette dernière année, j'ai aimé travailler à vos côtés.

À l'ensemble de mes co-internes avec qui j'ai eu la chance de partager mes stages à Bordeaux, à Limoges, à Toulouse, en Martinique, en Nouvelle-Calédonie et à Arcachon.

À Léa et Hélié, vous occupez maintenant une petite place dans ma vie et j'en suis heureuse.

À ceux rencontrés en Martinique, internes ou non et en particulier Estelle et Pauline. Merci au kawann triathlon club qui m'a transformée en « vraie » sportive le temps de mon passage aux Antilles.

À Vivien et toute l'équipe de nantais rencontrée grâce à lui : Tiphaine, Lola, Aicha, Marie, P-A, Pierre...et tous les autres, pour la plupart je vous connais depuis moins d'un an, j'ai passé de très bonnes soirées avec vous et j'espère continuer.

Aux Poilus : Elise Emilie Pavel Jeff Cas Simon sans oublier les anciens que j'ai pu croiser.

À toute la Team pharma, ma binôme Caro, mes demi-binômes Marie et Marion qui me suivent depuis la première année et tous les autres sans qui ces études n'auraient pas eu la même saveur.

À Léa, depuis le collège je peux compter sur toi, nous avons partagé beaucoup de bons moments ensemble et la distance n'a jamais rien changé. Je t'admire pour la personne que tu es.

Aux Jackots qui ont toujours été là pour moi, certains depuis le collège : Léa, Seb, Candice, Mathilde, Lionel, Théo, Marie...et toute l'équipe qui s'agrandit !

À Alexis et Julien. Alexis on se connaît depuis le collège, je sais que le temps et la distance n'affectent pas notre relation.

À Raph et Olivier, pour tous les bons moments partagés avec vous.

À Damien et Manue, mes références rando et voyage.

À la team du gr20 qui m'a aidé à bien me vider la tête avant d'entamer la dernière ligne droite de la rédaction de la thèse.

Et enfin merci à ma famille sans qui rien de tout cela n'aurait été possible :

À Papa, Maman, tout au long de mes études vous m'avez toujours soutenue, aidée, conseillée, encouragée. Je vous dédie aujourd'hui cette thèse, merci pour tout. Merci maman pour les relectures.

À Suzanne, pour la relecture minutieuse et le soutien durant toutes ces années d'études.

À Carmen, pour avoir toujours été présente et m'avoir supportée au quotidien malgré des modes de vie différents.

À Arthur et Vina, pour m'avoir donné cette merveilleuse nièce qu'est Elya.

Table des matières

1.	Première partie : Introduction	11
1.1	La Nouvelle-Calédonie.....	11
1.1.1	Histoire politique récente	11
1.1.2	Géographie	12
1.1.3	Climat	13
1.1.4	Démographie.....	13
1.1.5	Structures de soins	14
1.2	Diptérie.....	17
1.2.1	Historique	17
1.2.2	Épidémiologie.....	18
1.2.3	Transmission.....	19
1.2.4	Pouvoir pathogène	19
1.2.5	Bactériologie.....	21
1.2.6	Biologie moléculaire	29
1.2.7	Toxine	30
1.2.8	Traitement.....	33
1.2.9	Prophylaxie.....	35
1.2.10	Mesures d'hygiène et de santé publique	37
2.	Deuxième partie : Matériel et méthode	42
2.1	Objectifs de l'étude	42
2.2	Origine des données et des souches	42
2.3	Critères d'inclusion et d'exclusion.....	42
2.4	Clinique et étude des dossiers patients	43
2.5	Investigations autour des cas	44
2.6	Tests phénotypiques	45
2.6.1	Étude de la résistance aux antibiotiques.....	45
2.6.2	Test Elek	45
2.6.3	Détermination du biovar	47
2.7	Biologie moléculaire	48
2.7.1	Détection du gène tox.....	48
2.7.2	Next generation sequencing (NGS)	49
2.7.3	Étude de la diversité des souches	50
2.7.4	Détermination des gènes de résistance	51

3.	Troisième partie : résultats	52
3.1	Données épidémiologiques	52
3.1.1	Répartition géographique des cas.....	52
3.1.2	Évolution du nombre annuel de cas.....	52
3.1.3	Données cliniques	53
3.1.4	Investigations autour des cas	54
3.2	Données d'antibiorésistance	57
3.3	Biologie moléculaire	65
3.3.1	Diversité génétique des souches.....	65
4.	Quatrième partie : discussion	68
4.1	Répartition des souches dans l'espace et dans le temps	68
4.1.1	Répartition géographique des souches.....	68
4.1.2	Augmentation de l'incidence	68
4.2	Étude de l'antibiorésistance	69
4.3	Biologie moléculaire	74
4.3.1	Relation phénotype génotype.....	74
4.3.2	Diversité des souches néo-calédoniennes	76
4.4	Données cliniques	79
4.4.1	Endocardites.....	79
4.4.2	Colonisation des plaies	79
4.4.3	Portage asymptomatique.....	80
4.5	Hygiène hospitalière.....	80
4.6	Vanuatu	81
5.	Conclusion	83

Table des Annexes :

Annexe 1 :	Bon de transmission des souches	89
Annexe 2 :	Questionnaire du CNR	90
Annexe 3 :	Mode opératoire de réalisation de l'antibiogramme de <i>C. diphtheriae</i>	97

Table des tableaux

Tableau 1 : Population par province à chaque recensement (7).	14
Tableau 2 : Différenciation biochimique des différents biovars de <i>C. diphtheriae</i> (30).	22
Tableau 3 : Schémas d'administration préconisés pour les antibiotiques recommandés en cas de diphtérie (60).	38
Tableau 4 : Schémas d'administration préconisés pour l'antibioprophylaxie de la diphtérie (60).	39
Tableau 5 : Conduite à tenir lors d'une atteinte cutanée (60).	40
Tableau 6 : Conduite à tenir lors d'une atteinte ORL (60).	40
Tableau 7 : Données d'antibiorésistance de la pénicilline G.	65
Tableau 8 : Comparaison des CASFM 2013 et 2019 pour <i>C. diphtheriae</i>	70

Table des figures

Figure 1 : Situation de La Nouvelle-Calédonie dans le Pacifique (4).	12
Figure 2 : Carte des différentes provinces de Nouvelle-Calédonie (5).	13
Figure 3 : Principales structures de soin de la Nouvelle-Calédonie (DASS).	16
Figure 4 : Évolution du nombre de cas et de la couverture vaccinale dans le monde (19).	18
Figure 5 : Anatomie des voies respiratoires supérieures, coupe sagittale.	20
Figure 6 : Aspect des colonies de <i>C. diphtheriae</i> sur gélose au sang.	23
Figure 7 : Aspect des colonies de <i>C. diphtheriae</i> sur milieu Tinsdale (32).	24
Figure 8 : Division de <i>C. diphtheriae</i> , vue au microscope électronique (15).	24
Figure 9 : Spectre d'identification d'une souche de <i>C. diphtheriae</i>	26
Figure 10 : Utilisation du test TQS.	28
Figure 11 : Structure de la toxine diphtérique. (A) Représentation schématique des trois domaines structuraux. Le site de clivage de la furine entre les deux fragments A et B est représenté par une flèche. (B) Structure tridimensionnelle de la toxine diphtérique (17).	31
Figure 12 : Mode d'action de la toxine diphtérique (53).	32
Figure 13 : Cerfa de déclaration (61).	36
Figure 14 : Plan de dépose du test Elek (CNR des corynebactéries du complexe <i>diphtheriae</i>).	46
Figure 15 : Vue à la loupe binoculaire des arcs de précipitation (CNR des corynebactéries du complexe <i>diphtheriae</i>).	47
Figure 16 : Principe du NGS.	50
Figure 17 : Répartition du nombre de cas par commune. Carte réalisée par Simon Joxe.	52
Figure 18 : Nombre de cas de diphtérie par an.	53
Figure 19 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices pour la pénicilline G (sensible si $\leq 0,125$ mg/L).	58

Figure 20 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la pénicilline G 1UI (sensible si ≥ 29 mm).	58
Figure 21 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la pénicilline G 10 UI, solution 0,5 McF diluée au 10ème (CASFM 2013) (sensible si ≥ 29 mm, résistant si < 18 mm).	59
Figure 22 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices pour l'ampicilline (sensible si ≤ 2 mg/L).	59
Figure 23 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la gentamicine (sensible si ≥ 23 mm).	60
Figure 24 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la ciprofloxacine (sensible si ≥ 25 mm).	60
Figure 25 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la clindamycine (sensible si ≥ 20 mm).	61
Figure 26 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la rifampicine (sensible si ≥ 30 mm).	61
Figure 27: Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole (sensible si ≥ 19 mm).....	62
Figure 28 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la tétracycline (sensible si ≥ 24 mm).	62
Figure 29 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour l'érythromycine, solution 0,5 McF diluée au 10ème (CASFM 2013) (sensible si ≥ 22 mm).	63
Figure 30 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour l'azithromycine, solution 0,5 McF diluée au 10ème (CASFM 2013) (sensible si ≥ 22 mm).	63
Figure 31 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la vancomycine (sensible si ≥ 17 mm).	64
Figure 32 : Arbre phylogénétique des souches étudiées.	67
Figure 33 : Évolution du nombre de cas annuels de diphtérie et dates d'arrivée des deux Maldi-TOF sur le territoire.	69
Figure 34 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la tétracycline.....	71
Figure 35 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la pénicilline G.....	71
Figure 36 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole.	73
Figure 37 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la gentamicine.....	74
Figure 38 : répartition des gènes codant pour le métabolisme bactérien au sein de la cohorte.	76
Figure 39 : Répartition des deux clusters investigués dans l'arbre phylogénétique.....	77
Figure 40 : Localisations des trois principaux sous-lineages retrouvés en Nouvelle-Calédonie.....	78
Figure 41 : Pourcentage des enfants de 12 à 23 mois vaccinés contre la diphtérie au Vanuatu de 1982 à 2019 (72).....	81
Figure 42 : Pourcentage des enfants de 12 à 23 mois vaccinés contre la diphtérie au Vanuatu de 2012 à 2019 (72).....	82

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

BHR : Bactéries hautement résistantes

BLAST : Basic local alignment search tool (outil de recherche d'alignement local)

BMR : Bactéries multi résistantes

°C : Degré Celsius

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

cgMLST : *Core* genome multilocus sequence typing

cgMSA : Alignement de séquences multiples du génome central

CHN : Centre hospitalier du Nord

CHS : Centre hospitalier spécialisé

CHT : Centre hospitalier territorial

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMS : Centre médico-social

CNR : Centre national de référence

CO₂ : Dioxyde de carbone

CRP : Protéine C réactive

DASS : Direction des affaires sanitaires et sociales

DL50 : Dose létale 50

DMM : Dose minimale mortelle

DT : Toxine diphtérique

DTP : Tétanos diphtérie poliomyélite

EF2 : Facteur d'élongation des protéines 2

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ETO : Échographie trans œsophagienne

ETT : Échographie trans thoracique

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GFF : General feature format
HCSP : Haut conseil de santé publique
IDE : Infirmier(ère) diplômé(e) d'état.
IPNC : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
IV: Intraveineuse
Maldi-TOF-MS : Matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight – mass spectrometry
McF : McFarland
MDO : Maladie à déclaration obligatoire
MH : Mueller-Hinton
MH-F : Gélose Mueller-Hinton + 5 % de sang de cheval + 20 mg/L β -NAD
MLST : Multi locus sequence typing
MNI : Mononucléose infectieuse
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NCBI : National center for biotechnology information
NCTC : National collection of type Culture
NGS : Next-generation sequencing ou séquençage haut débit.
NTTB : Non-toxigenic tox-bearing
ORL : Oto-rhino-laryngé
PCC : Précautions complémentaires contact
PCR : Polymerase chain reaction
ProHB-EGF : Pro heparin-binding epidermal growth factor
RAA : Rhumatisme articulaire aigu
SIL : Système informatique du laboratoire
SL : Sublineage
SLT-1 : Shiga like toxine-1
SNP : Single nucleotide polymorphism
ST : Séquence type
TQS : Tetanos Quick Stick®
WGS : Whole genome sequencing

Pour se conformer aux usages, certains mots sont volontairement laissés en anglais dans l'ensemble de la thèse.

1. Première partie : Introduction

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse d'exercice, au cours d'un stage de treize mois dans le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Territorial (CHT) de Nouvelle-Calédonie. Lors de mon arrivée, un nombre de cas croissant d'isolements de *Corynebacterium diphtheriae* a été relevé en Nouvelle-Calédonie. En particulier, la récente survenue d'une épidémie de souches porteuses du gène de la toxine diphtérique avait mis en lumière la potentielle gravité de cette infection et les répercussions en termes d'actions de santé publique à mettre en place. Dans ce contexte, nous avons décidé de commencer une étude sur les cas de *C. diphtheriae* isolés au laboratoire, en étudiant les contextes cliniques et les souches associées à chaque isolement. Les profils de sensibilité aux antibiotiques ont été étudiés et les souches ont été séquencées puis analysées avec le soutien du centre national de référence (CNR) des corynebactéries du complexe *diphtheriae*.

1.1 La Nouvelle-Calédonie

1.1.1 Histoire politique récente

Colonie française depuis 1853, la Nouvelle-Calédonie devient un territoire d'outre-mer à partir de 1946.

Suite à un conflit politique opposant les loyalistes (favorables au maintien de la Nouvelle-Calédonie au sein de la République française) et les indépendantistes, les accords de Matignon sont conclus le 26 juin 1988 par Jean-Marie Tjibaou et Jacques Lafleur, sous l'égide du gouvernement français.

Ces accords prévoient une période de développement de dix ans, avec des garanties économiques et institutionnelles pour la communauté kanak, avant que les néo-calédoniens n'aient à se prononcer sur leur avenir. Dans le même temps, sont mises en place trois provinces (Sud, Nord et Îles) qui ont pour objectif de servir de cadre au rééquilibrage économique et social.

Un second accord (l'accord de Nouméa) signé 10 ans plus tard, le 5 mai 1998, prévoit des référendums d'autodétermination (jusqu'à trois successifs en cas de victoire du « non » à l'indépendance) pour la Nouvelle-Calédonie ainsi qu'un transfert de certaines compétences de la France vers la Nouvelle-Calédonie dans de nombreux domaines, excepté les compétences régaliennes (la défense, la sécurité, la justice et la monnaie).

Ce n'est qu'à partir de 1999 que la Nouvelle-Calédonie devient une collectivité spécifique de la république française. Depuis cette date, elle dispose d'un statut particulier de large autonomie instauré par l'accord de Nouméa. Depuis l'accord de Nouméa, régi par la loi organique du 19 mars 1999, c'est le gouvernement de la Nouvelle-Calédonie qui est l'organe exécutif néo-calédonien (1).

Les deux derniers référendums, ayant eu lieu respectivement le 4 novembre 2018 et le 4 octobre 2020, ont donné une majorité de « non » à l'indépendance (56,40 % et 53,26 %) (2).

1.1.2 Géographie

La Nouvelle-Calédonie est un archipel d'Océanie qui se trouve dans l'océan Pacifique. Ce territoire de 18 575 km² se situe à 1500 km à l'est de l'Australie, à 2 000 km au nord de la Nouvelle-Zélande et à 17 000 km de la métropole. Sur la carte du monde qui suit, la Nouvelle-Calédonie et son archipel voisin le Vanuatu ont été mis en avant.

La Nouvelle-Calédonie comprend la Grande Terre : 500 km de long sur une cinquantaine de km de large, les quatre îles Loyauté (Ouvéa, Lifou, Tiga et Maré), l'archipel des îles Belep, l'île des Pins et quelques îlots. L'île principale, la Grande Terre, est découpée en 2 provinces : Sud et Nord. Les 4 îles Loyauté forment la province des Îles. Le point culminant est le Mont Panié (1 629 m) (3).

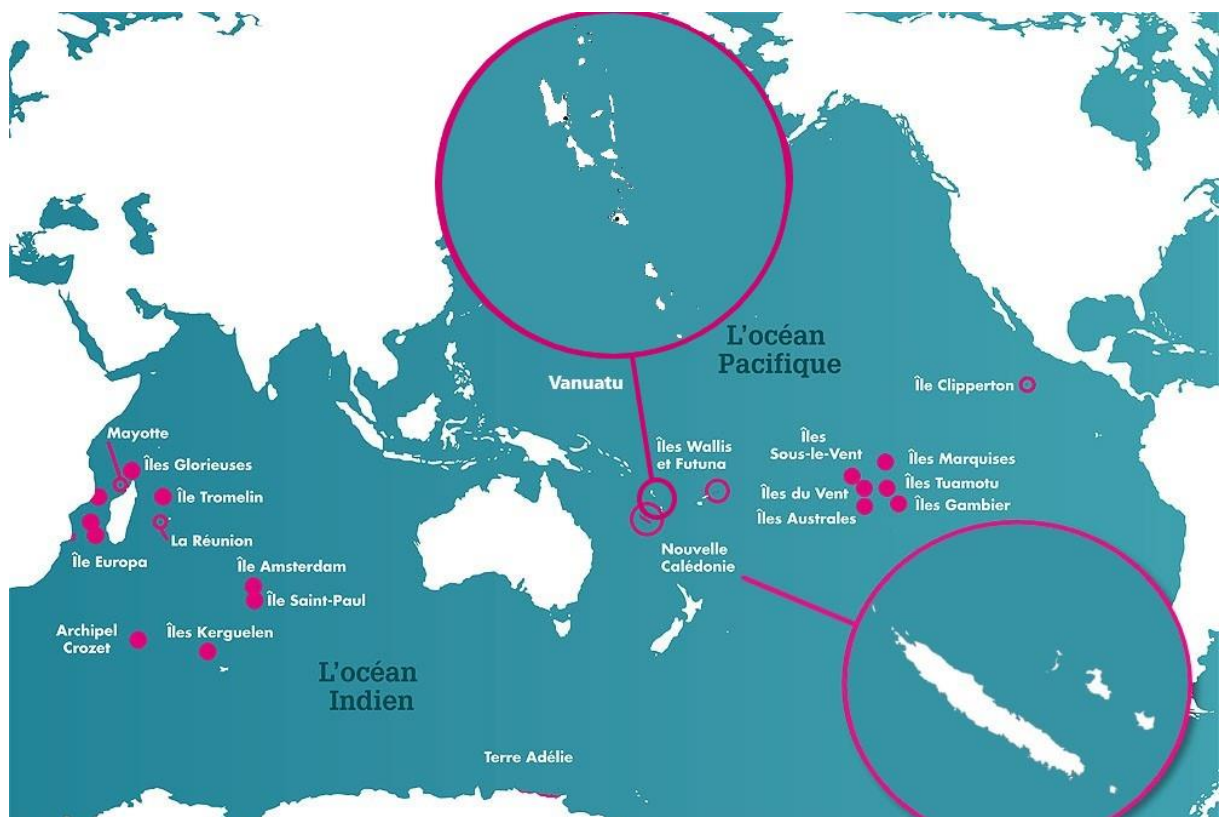


Figure 1 : Situation de La Nouvelle-Calédonie dans le Pacifique (4).



Figure 2 : Carte des différentes provinces de Nouvelle-Calédonie (5).

1.1.3 Climat

Le climat est de type tropical, avec un taux d'humidité élevé (73 % à 81 %). Il y a deux saisons : une saison chaude et humide (saison des cyclones, novembre à avril) et une saison sèche et fraîche (hiver austral, mai à octobre). La température moyenne sur l'année est d'environ 23°C. Une barrière montagneuse, la chaîne centrale, s'élève au centre de la Grande Terre et marque une différence nette de climat entre les deux côtes. L'ouest, plutôt sec, est le domaine des savanes de niaoulis et des grandes exploitations de bétail. À l'est, plus humide et donc plus luxuriant, le littoral est plus étroit (3).

1.1.4 Démographie

D'après le dernier recensement de 2019, la population de la Nouvelle-Calédonie est de 271 407 personnes (7).

La croissance démographique est importante, comme en témoigne le tableau 1. D'autre part, la population est inégalement répartie sur le territoire : 75 % des habitants habitent la province Sud, 67 % habitent le Grand Nouméa (communes de Nouméa, Dumbéa, Mont-Dore et Païta) et 34,7 % habitent Nouméa.

Provinces	ANNEE DU RECENSEMENT										
	1956	1963	1969	1976	1983	1989	1996	2004	2009	2014	2019
Province des îles Loyauté	10 878	11 409	12 248	14 518	15 510	17 912	20 877	22 080	17 436	18 297	18 353
Province Nord	24 176	25 781	27 181	32 021	31 310	34 526	41 413	44 474	45 137	50 487	49 910
Province Sud	33 426	49 329	61 150	86 694	98 548	111 735	134 546	164 235	183 007	199 983	203 144
Nouvelle-Calédonie	68 480	86 519	100 579	133 233	145 368	164 173	196 836	230 789	245 580	268 767	271 407

Tableau 1 : Population par province à chaque recensement (7).

En 2019, 41,2 % de la population se déclare appartenir à la communauté kanak. Ce chiffre est de 95 % pour la province des Îles, 72 % pour la province Nord et 29 % pour la province Sud. 48 % de cette population vit en tribu. La communauté européenne représente 24 % de la population, la communauté wallisienne et futunienne 8,3 %. Les autres communautés (tahitiens, indonésiens, ni-vanuatu, vietnamiens) rassemblent moins de 8 % de la population. 11 % se déclarent métis et 7,5 % ne se déclarent d'aucune communauté (8).

En 2019, 91 % des ménages néo-calédoniens disposent du confort élémentaire : raccordement au réseau général d'électricité, présence d'eau courante, de WC et d'installation sanitaire. Ce taux est de 82 % en province Nord et 69 % dans la province des Îles. Au total, 8 200 ménages et 24 700 personnes n'ont pas accès aux commodités de base. Ces familles habitent essentiellement dans les tribus les plus éloignées ou dans les squats du grand Nouméa. L'accès à internet est également très inégal en fonction des provinces : 17 % des ménages dans la province des Îles Loyauté, 41 % dans la province Nord et 69 % dans la province Sud (9).

1.1.5 Structures de soins

Les soins de santé primaire et les programmes en matière de protection maternelle et infantile, de surveillance des grossesses, de suivi et de vaccination des enfants sont assurés par les centres médico-sociaux (CMS) et le secteur libéral.

La même organisation existe sur les trois provinces, avec des spécificités : le secteur libéral est très développé sur les communes du Grand Nouméa, alors qu'en provinces Nord et des Îles, ces soins sont essentiellement assurés par les CMS.

L'ensemble des centres médico-sociaux disposent de 72 lits d'observation, étiquetés lits de médecine et d'obstétrique. Les particularités géographiques de la Nouvelle-Calédonie ont en effet contraint les collectivités provinciales à équiper leurs structures de soins de lits physiques à vocation multiple.

Le Centre Hospitalier du Nord (CHN) sur les sites de Koumac, Koné et de Poindimié assure une activité d'hospitalisation de proximité et dispose au total de 128 lits. Le site de Koumac dispose de services d'urgences et de médecine, d'une unité en soins continus et d'un centre périnatal de proximité avec une consultation de sage-femme ; la structure dispose de 20 lits. Le site de Poindimié comprend des services de médecine, de médecine physique et de réadaptation, d'urgences et un centre périnatal

de proximité avec une consultation de sage-femme, regroupant au total 46 lits. Le site de Koné, ouvert en 2018, comporte des services d'urgence, de médecine générale, un hôpital de jour, une unité de soins continus, un bloc chirurgical, un bloc obstétrical et un scanner, représentant un total de 62 lits.

Les soins nécessitant un plateau technique spécialisé sont dispensés par la clinique Kuindo-Magnin et le Centre Hospitalier Territorial (CHT) Gaston Bourret, récemment déménagé sur le Médipôle de Dumbéa. Ils comportent 284 lits pour la clinique et 528 lits pour le CHT dont 70% en chambre seule. Ils occasionnent des transferts de patients originaires des provinces Nord, Îles et Sud, par voie terrestre ou aérienne, en fonction de l'état des malades et du degré d'urgence à les prendre en charge.

Le Centre Hospitalier Spécialisé (CHS) Albert est le seul établissement d'accueil et de traitement des personnes atteintes de troubles psychiques ; il est également la seule structure hospitalière de gériatrie. Il comporte 130 lits dédiés à la psychiatrie et 60 dédiés à la gériatrie.

En cas de besoin, les malades sont évacués en Australie ou en métropole, pour des soins ne pouvant être assurés sur place (chirurgie cardiaque, neurochirurgie, oncohématologie) (10).

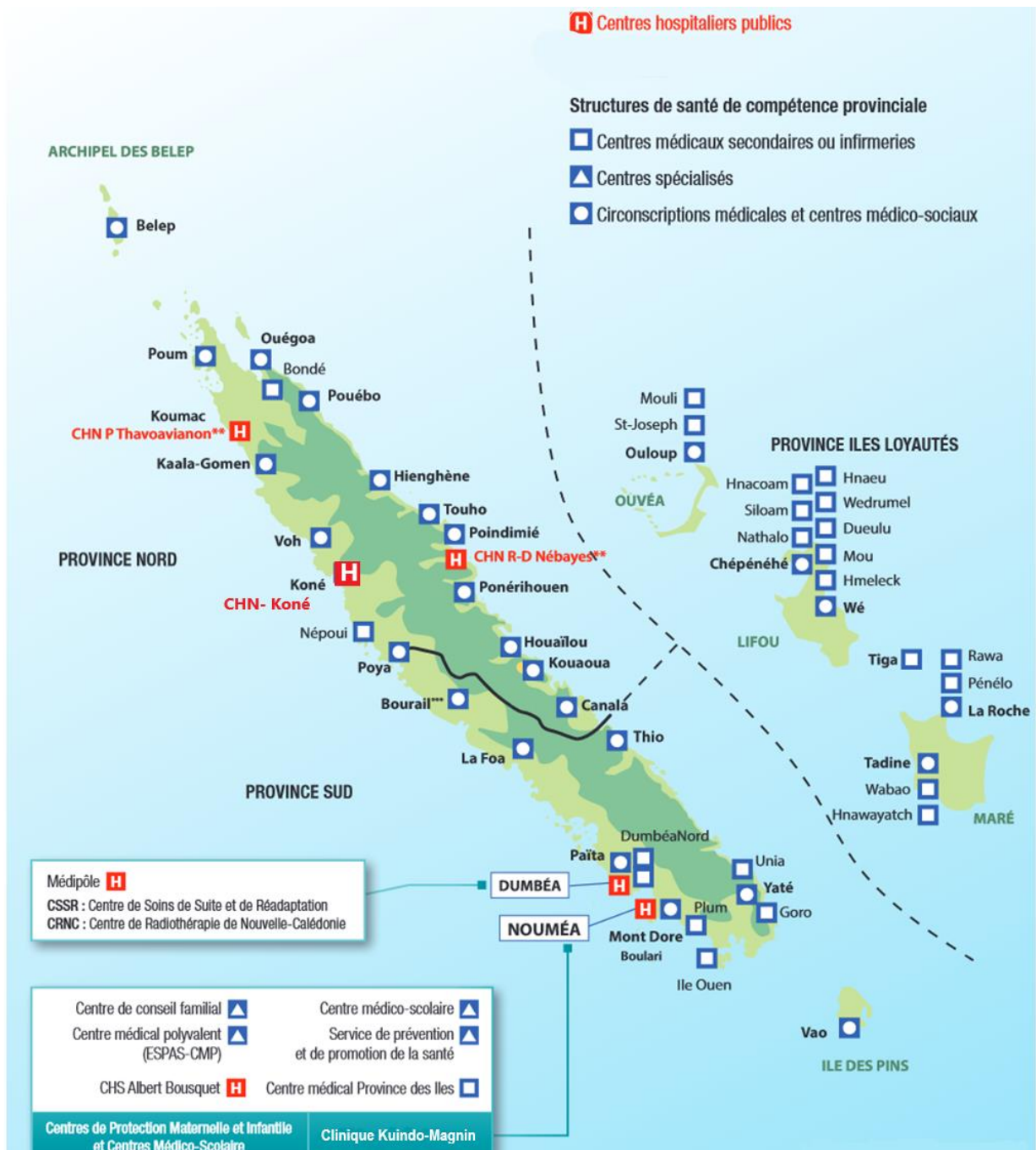


Figure 3 : Principales structures de soin de la Nouvelle-Calédonie (DASS).

1.2 Diphtérie

1.2.1 Historique

400 avant JC : Hippocrate décrit déjà une épidémie de toux avec paralysies qui pourrait correspondre aux premières descriptions cliniques de la maladie (11).

1826 : Pierre Bretonneau décrit les manifestations cliniques dont l'angine pseudo membraneuse.

De 1825 à 1855 : Pierre Bretonneau et Emile Trousseau préconisent et réalisent la trachéotomie comme traitement des diphtéries avec obstruction des voies aériennes supérieures.

1855 : J-F Reybard propose une alternative à la trachéotomie : l'intubation. La technique est peu suivie dans un premier temps en France, bien que soutenue par le docteur Eugène Bouchut. Elle ne se généralise en France qu'à partir de la fin du dix-neuvième siècle (12).

1883 : Klebs montre que la bactérie *C. diphtheriae* est l'agent responsable de la diphtérie.

1884 : Loeffler met en évidence le fait que la bactérie ne se développe qu'au niveau de la gorge et que les effets sur les organes internes sont dus à une toxine soluble.

1888 : Roux et Yersin montrent que des animaux à qui on a injecté des extraits stériles de *C. diphtheriae* développent des atteintes d'organes similaires à celles observées lors de l'infection humaine. Cela démontre que la toxine est le facteur de virulence principal de *C. diphtheriae*.

1891 : Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato effectuent le premier traitement d'un enfant avec un sérum d'un animal immunisé contre la toxine diphtérique.

1923 : Gaston Ramon montre que la toxine traitée au formol perd son pouvoir pathogène tout en conservant son immunogénicité. Cette anatoxine est aujourd'hui encore la base de la vaccination.

1928 : Fleming découvre la pénicilline à partir du champignon *Penicillium notatum*. Les premières utilisations chez l'homme se feront quelques années plus tard, révolutionnant la prise en charge des maladies infectieuses.

1931 : La vaccination antidiphtérique est rendue obligatoire pour le service militaire.

1938 : La vaccination antidiphtérique est rendue obligatoire pour tous.

1948 : Mise au point du test d'Elek (13) par Stephen Dyonis Elek, pour tester la sécrétion de la toxine.

1952 : Découverte de l'érythromycine, chef de file de la classe des macrolides, alternative aux bêtalactamines.

2003 : Premier séquençage complet de la bactérie (14).

(15) (16) (17)

1.2.2 Épidémiologie

Autrefois cause majeure de mortalité infantile, le taux d'incidence de la diphtérie a considérablement diminué, passant de près d'un million de cas dans le monde par an en 1900, à 7 097 cas signalés en 2016. Bien que la découverte de l'antitoxine et l'apparition de l'antibiothérapie aient contribué à ce déclin, la majeure partie est cependant attribuable à la vaccination. En 2016, la couverture vaccinale mondiale était estimée à 86 % de la population (18).

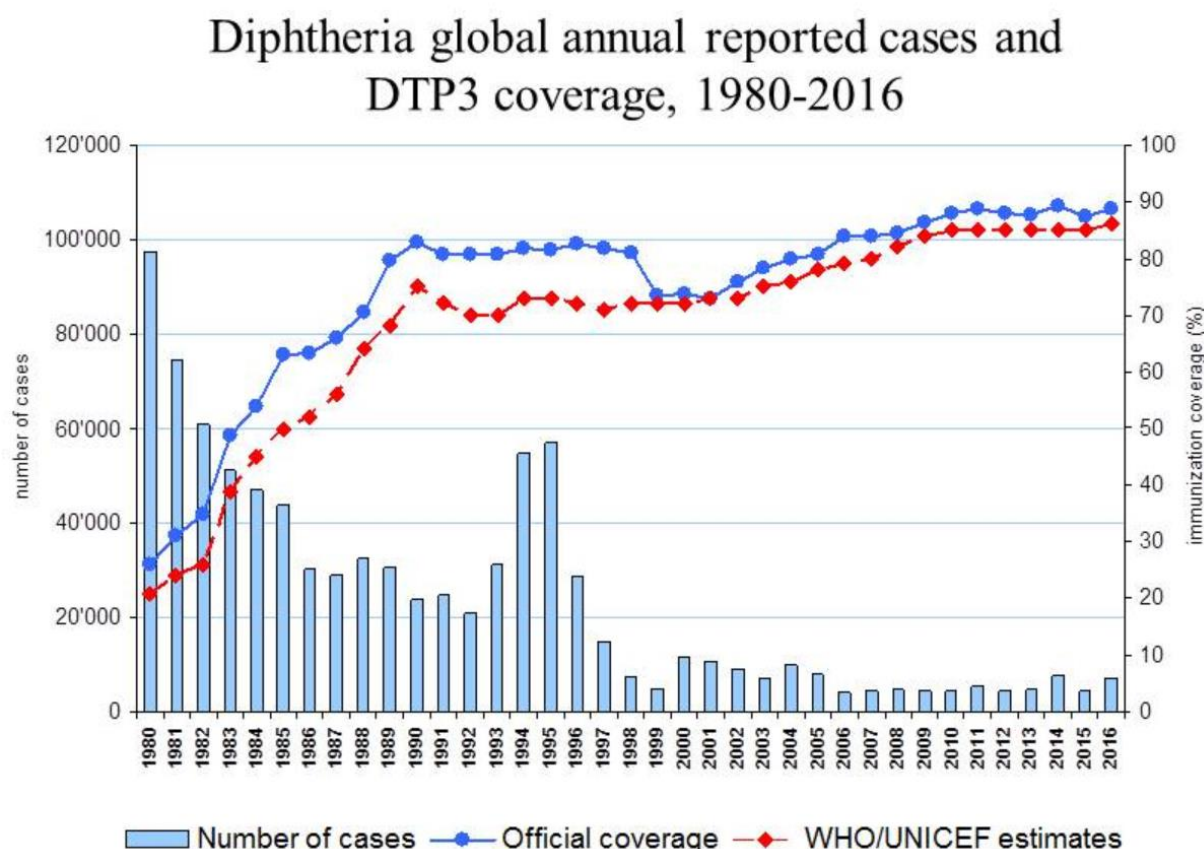


Figure 4 : Évolution du nombre de cas et de la couverture vaccinale dans le monde (19).

L'augmentation du nombre de cas dans les années 90 est due à une épidémie ayant touché les pays membres de l'ex-URSS. Plus de 157 000 cas dont 5 000 mortels ont été signalés dans la période 1990 à 1998 (11). Depuis cette date, la maladie évolue sous forme sporadique et sous forme épidémique. Les épidémies sont en général liées à une baisse locale de la couverture vaccinale et associées à des troubles politiques et des déplacements de population, comme pour les épidémies survenues au Venezuela, au Yémen, en Haïti, au Nigeria, en Inde, à Madagascar ou bien encore dans des camps de réfugiés rohingyas au Bangladesh (18,20).

Une bonne couverture vaccinale permet de diminuer considérablement le portage de *C. diphtheriae* possédant le gène *tox*. Dans ces populations, on observe néanmoins un portage de souches non toxigènes, qui peuvent potentiellement acquérir le gène *tox* par transmission horizontale via le phage β . Ce portage est plus fréquent en zones tropicales, au niveau cutané en particulier (21).

1.2.3 Transmission

Le complexe *diphtheriae* regroupe les espèces *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae* et les trois nouvelles espèces *C. silvaticum*, *C. belfantii* et *C. rouxii* depuis 2020, 2018 et 2020 respectivement (22–24). Les infections à *C. silvaticum*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis* sont des zoonoses touchant les humains après contact direct ou indirect avec les animaux. Pour *C. ulcerans*, ces animaux sont souvent les chiens et les chats et de manière indirecte lors de la consommation de produits laitiers produits par des animaux ayant des lésions au niveau des pis. Pour *C. pseudotuberculosis*, c'est plus particulièrement les caprins et ovins qui semblent touchés. *C. silvaticum* n'a été décrit que chez les sangliers et les chevreuils. La transmission est essentiellement interhumaine pour les espèces *C. diphtheriae*, *C. belfantii* et *C. rouxii*.

Le bacille est habituellement présent dans les voies aériennes supérieures et la transmission se fait alors via les gouttelettes de Pflügge émises en parlant, toussant, éternuant, surtout à partir des sujets non traités. La transmission peut également se faire par contact avec des lésions cutanées. La diphtérie cutanée joue probablement un rôle important pendant les périodes inter-épidémiques.

Les personnes asymptomatiques peuvent transmettre la maladie, bien que les sujets symptomatiques la transmettent de façon plus importante (18).

L'incubation est courte, souvent 2 à 5 jours.

1.2.4 Pouvoir pathogène

1.2.4.1 Atteintes ORL

L'atteinte des muqueuses de l'arbre respiratoire supérieur est la plus habituelle : c'est l'angine diphtérique.

Classiquement, il y a une atteinte de la partie postérieure de la bouche et proximale du pharynx. Une membrane se développe sur une ou les deux amygdales, puis s'étend aux piliers amygdaliens, l'uvule palatine (luette), le palais mou, l'oropharynx et le nasopharynx. On retrouve une dysphagie importante. *C. diphtheriae* se multiplie à la surface de la muqueuse, créant la pseudomembrane, blanche initialement puis virant au gris, voire sur la fin au vert ou noir dû à la nécrose. L'œdème et le recouvrement par la pseudomembrane de la paroi de la trachée peuvent réduire et éventuellement bloquer le flux d'air à travers l'arbre respiratoire, responsable de cyanose puis de suffocation de la personne infectée (croup).

Au niveau biologique, une polynucléose est fréquente, aidant au diagnostic différentiel avec la mononucléose infectieuse (MNI). Une thrombopénie et une cytolyse hépatique sont également retrouvées.

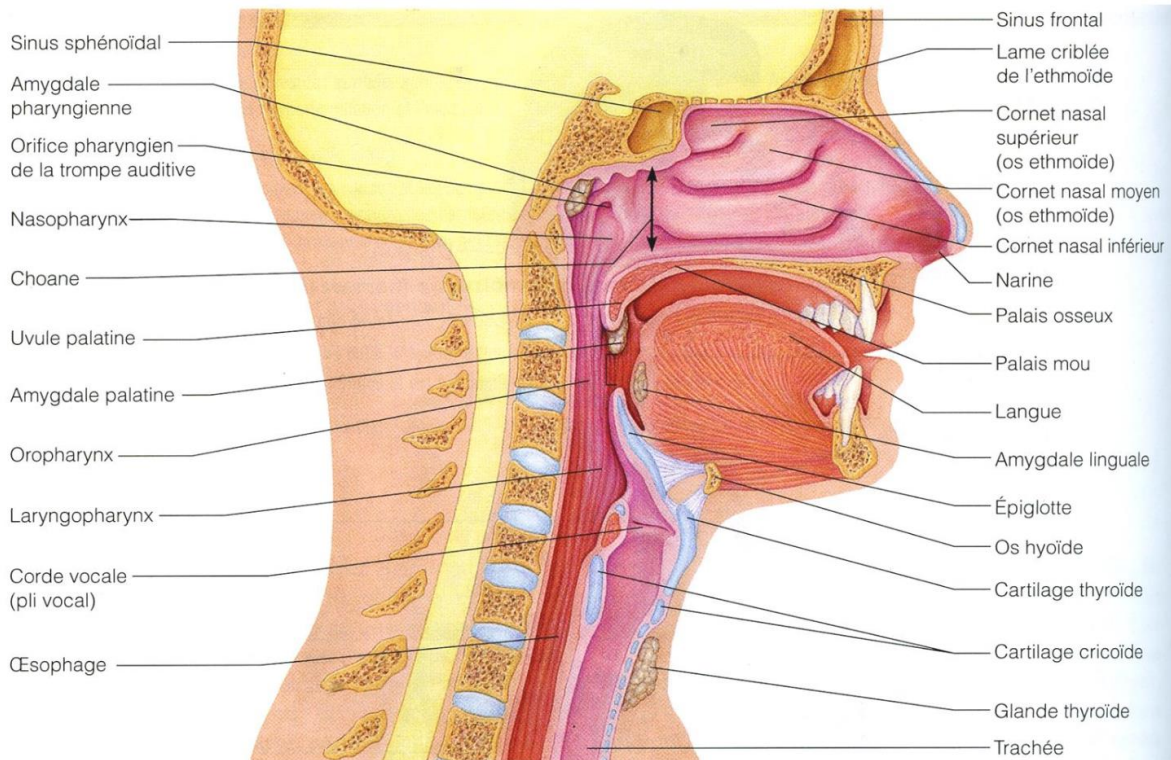


Figure 5 : Anatomie des voies respiratoires supérieures, coupe sagittale.

L'afflux de lymphe dans les ganglions cervicaux provoque un gonflement important et participe au phénomène. Une fièvre élevée est fréquente (16) (25).

Le développement de la bactérie reste localisé mais l'exotoxine est adsorbée dans le sang et provoque les manifestations sévères systémiques décrites ci-après.

1.2.4.2 Atteintes cutanées

La diphtérie cutanée se développe sur une lésion initiale, qui peut être variée en localisation, en manifestations cliniques et en cause infectieuse (association fréquente avec *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*). Il n'y a donc pas de présentation pathognomonique de la maladie. Souvent, on retrouve une lésion inflammatoire exsudative due à la surinfection de la lésion initiale, généralement traumatique (plaie, piqûre d'insecte...). La lésion initiale, une griffure par exemple, s'agrandit au lieu de cicatriser. Les berges initialement linéaires deviennent rondes, déclives, indurées et d'un rouge violacé. Le fond se creuse touchant tout l'épiderme mais ne s'étend jamais aux muscles ou aux tendons. L'ulcère ainsi constitué est grossièrement rond, douloureux. Le fond généralement propre est recouvert d'une croûte grise verdâtre d'où suinte un liquide séro purulent. Occasionnellement, on retrouve des fausses membranes difficiles à décoller, faisant ressembler l'ulcère à une escarre. Les lésions sont fréquemment multiples et situées aux extrémités, souvent les jambes. Les complications liées aux souches toxigènes sont moins fréquentes que dans l'angine diphtérique et sont préférentiellement d'ordre neurologique plutôt que cardiaque (10).

1.2.4.3 Complications systémiques

Ce sont ces manifestations qui font toute la gravité de l'infection. Elles sont dues à l'action de la toxine sur les neurones moteurs périphériques et sur le myocarde.

Manifestations neurologiques

Elles apparaissent entre 10 jours et 3 mois après l'épisode infectieux. Les symptômes initiaux observés comprennent des paralysies vélopalatines, des troubles de la phonation, de la déglutition et de l'accommodation. On retrouve également fréquemment des paralysies des muscles respiratoires pouvant nécessiter une assistance respiratoire, des hyporéflexies ou aréflexies, paresthésies et hypotonies des extrémités, des paralysies faciales, des paralysies du diaphragme, des pertes du tonus vasomoteur, des dysfonctions des nerfs crâniens (26).

Manifestations cardiaques

La myocardite aiguë est la complication cardiaque la plus fréquente. Elle est précoce (6 à 8 jours) et peut être dépistée par la réalisation d'un électrocardiogramme montrant une tachycardie, des troubles du rythme avec extrasystoles ventriculaires ou des blocs auriculo-ventriculaires. Dans les cas les plus sévères, on observe une insuffisance cardiaque aiguë, responsable du décès (26,27).

Les complications postdiphthériques comme les cardiomyopathies et les neuropathies résulteraient d'une inhibition auto-immune de la fonction de l'epidermal growth factor receptor (EGFR), due à une similarité d'épitope entre le domaine extracellulaire de l'EGFR et la sous-unité B de la toxine diphthérique. Cette inhibition pourrait endommager les tissus exprimant l'EGFR (28).

Autres formes cliniques

De nombreuses autres présentations moins fréquentes sont décrites : septicémies, endocardites, arthrites septiques...Plusieurs cas d'endocardites ont été identifiés et sont majoritairement le fait de souches ne portant pas le gène de la toxine diphthérique depuis que la couverture vaccinale mondiale a considérablement augmenté (29).

1.2.5 Bactériologie

1.2.5.1 Classification

La bactérie appartient au règne *Bacteria*, à l'embranchement *Actinobacteria*, à l'ordre *Actinomycetales*, à la famille *corynebacteriaceae*, au genre *corynebacterium*, à l'espèce *diphtheriae*.

Le genre *corynebacterium* comprend plus de cent espèces dont seulement quatre sont susceptibles de produire la toxine diphthérique : *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* et *C. belfantii*. *C. silvaticum* porte le gène *tox* mais ne produit pas la toxine (24). *C. rouxii* n'a pas encore été décrite comme porteuse du gène *tox*.

Les corynebactéries du complexe *diphtheriae* comprennent les six espèces *C. diphtheriae*, *C. belfantii*, *C. rouxii*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* et *C. silvaticum*.

L'espèce *C. diphtheriae* a été historiquement divisée en quatre biovars : *gravis*, *intermedius*, *belfanti* et *mitis*. Cette différenciation sur des critères biochimiques est assez peu reproductible entre laboratoires et n'a pas toujours été confortée par les études génomiques menées par la suite (30).

Historiquement, les critères biochimiques permettant la différenciation des quatre biovars sont les suivants (31):

- Biovar *gravis* : les souches fermentent la dextrine, le glycogène et l'amidon. Les souches possèdent une nitrate réductase.
- Biovar *intermedius* : les colonies ont un aspect différent : elles sont décrites comme étant petites et de grises à translucides, alors que les colonies des autres biovars seraient plutôt blanches. De plus, ce sont les seules colonies toujours non hémolytiques. Elles fermentent la dextrine et parfois le glycogène et l'amidon. Les souches possèdent une nitrate réductase.
- Biovar *mitis* : les souches peuvent rarement utiliser l'amidon et ne peuvent pas fermenter ni la dextrine ni le glycogène. Les souches possèdent une nitrate réductase.
- Biovar *belfanti* : Les souches ne peuvent pas réduire les nitrates ni utiliser le glycogène et l'amidon comme source de carbone.

Biovar	Lipophilism	Haemolysis ^a	Nitrate reduction	Ability to utilise ^b	
				Starch	Glycogen
Gravis	–	±	+	+	+
Intermedius	+	–	+	±	±
Mitis	–	±	+	±	–
Belfanti	–	?	–	–	–

^a Biovar *gravis* is haemolytic but some strains may be weakly haemolytic. Biovar *mitis* is weakly haemolytic. The haemolytic properties of biovar *belfanti* are not clear in the literature.

^b Strains of biovar *intermedius* may utilise glycogen and starch while *mitis* strains can rarely use starch but not glycogen.

Tableau 2 : Différenciation biochimique des différents biovars de *C. diphtheriae* (30).

Cette division phénotypique en biovars pose plusieurs problèmes :

L'un des critères est basé sur l'aspect des souches en culture en particulier pour le biovar *intermedius*, critère peu reproductible d'un laboratoire à l'autre car basé sur l'appréciation de l'observateur.

Certains gènes portant les activités enzymatiques comme la fermentation du glycogène ou la réduction des nitrates peuvent au cours de l'évolution disparaître, une souche descendant d'une lignée *gravis* et qui aura perdu sa capacité à utiliser le glycogène, sera alors classée à tort dans la lignée *mitis*.

Les galeries API® ne permettent pas la différenciation entre les biovars *mitis* et *intermedius*.

Les analyses par technique « multi locus sequence typing » (MLST) ont permis de diviser les souches en différents sequence types (STs), non corrélés au biovar (30).

Des études récentes ont proposé la création de deux nouvelles espèces incluant la majorité des souches présentant un phénotype correspondant à *C. diphtheriae* biovar *belfanti*. Ces nouvelles espèces sont *C. belfantii* (22) et *C. rouxii* (23).

1.2.5.2 Morphologie et caractères culturels

C. diphtheriae est un bacille Gram positif, de 0,5 à 1 µm de diamètre et 1,5 à 5 µm de long (15), granuleux à extrémités arrondies ou renflées. Les bacilles sont disposés en « V » et en palissade. La bactérie n'est pas capsulée ni sporulée, elle n'est pas mobile et possède un mode respiratoire de type aérobie anaérobie facultatif.

C. diphtheriae croit à 37°C sur des milieux ordinaires, mais la croissance est meilleure sur des milieux enrichis au sang ou gélose Mueller-Hinton + 5 % de sang de cheval + 20 mg/L β-NAD (MH-F). La croissance est également possible sur une gélose sélective à l'acide nalidixique. *C. diphtheriae* forme alors des colonies en 16 à 24 heures de 1 à 3 mm, lisses, grisâtres, crémeuses, parfois β hémolytiques sur gélose au sang. La gélose de Tinsdale permet de repérer facilement *C. diphtheriae* au sein d'une flore polymicrobienne, ce qui est souvent le cas des échantillons ORL ou cutanés : les colonies apparaissent alors noires entourées d'un halo brun lié à la présence d'une cystéinase spécifique des corynebactéries du complexe *diphtheriae*, entraînant la production de sulfure d'hydrogène (H₂S).



Figure 6 : Aspect des colonies de *C. diphtheriae* sur gélose au sang.



Figure 7 : Aspect des colonies de *C. diphtheriae* sur milieu Tinsdale (32).

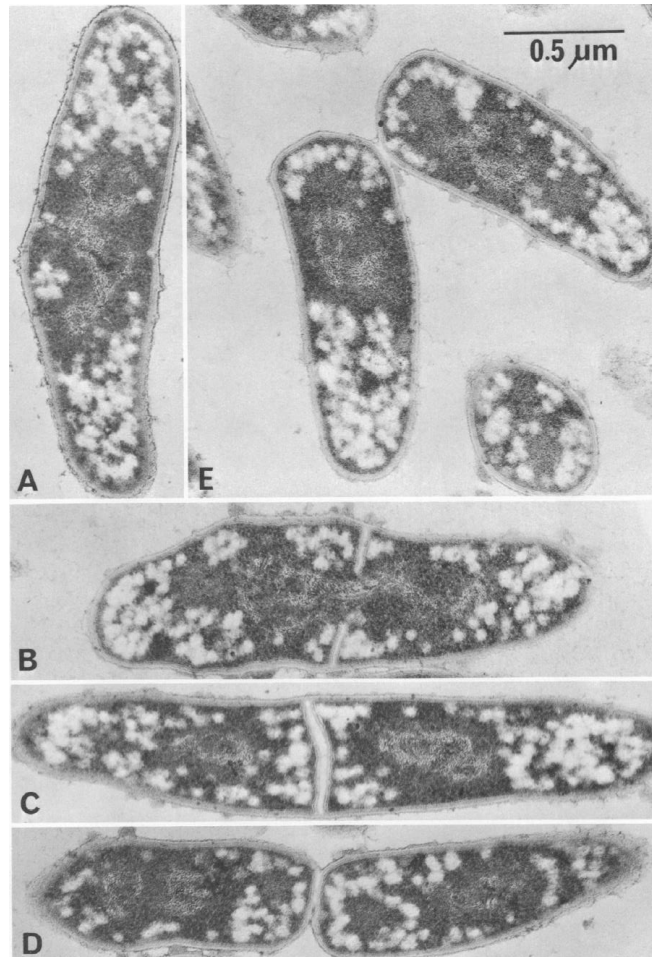


FIG. 2. *C. diphtheriae* strain C7, (-)^{ss} under conditions allowing for growth at maximal rate. (A) Initiation of septum formation by ingrowth of membrane. (B) Well-developed septal initials showing "layers" of the components of the cell envelope. (C) Two cells still connected showing that the septum consists of two full complements of membrane and envelope components. (D) Beginning of separation of cell doublets. (E) The "snapping" involved in the pulling apart of two corynebacterial cells, showing the characteristic taper from septal to distal end. Electron-opaque areas, peculiar to actively growing cells, seem not to be glycogen but may represent lipid associated with loci of intense biosynthetic activity. $\times 51,000$. Bar = 0.5 μm . From data of Sheila Heiner assembled by Kwang Shin Kim.

Figure 8 : Division de *C. diphtheriae*, vue au microscope électronique (15).

Caractéristiques biochimiques

Les colonies présentent une réaction positive pour la catalase, négative pour l'oxydase. Elles fermentent le glucose, la dextrine, le galactose et le maltose.

Les colonies ne fermentent pas le lactose, le saccharose et le mannitol.

Elles sont également uréase négative, indole négative, gélatinase négative, H₂S+ (présence d'une cystéinase).

1.2.5.3 Identification

Galleries

La galerie API®-Coryne, permet l'identification de *C. diphtheriae gravis* d'une part et *mitis/belfanti* d'autre part. Lors d'une identification par galleries API®-Coryne, les critères retenus sont :

- Plus de 95 % des souches sont négatives pour les enzymes suivantes : pyrazinamidase, pyrrolidonyl arylamidase, β-glucuronidase, β-galactosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, β-glucosidase (hydrolyse de l'esculine) uréase. Elles n'hydrolysent pas la gélatine, ne fermentent pas le xylose, le mannitol, le lactose et le saccharose.
- Pour la phosphatase alcaline, 12 % des souches de *gravis* et 1 % des souches de *mitis/belfanti* sont positives.
- Plus de 95 % des souches sont positives pour l'α- glucosidase et fermentent le glucose, le ribose et le maltose. La catalase est également positive.
- La nitrate réductase est retrouvée dans 99 % des souches de *gravis* et 46 % des souches *mitis/belfanti*. Bien que le producteur des galleries API®-Coryne ne le précise pas, on peut estimer que les souches identifiées comme appartenant au biovar *mitis/belfanti* et nitrate réductase négative appartiennent au biovar *belfanti* et celles nitrate réductase positive au biovar *mitis*.
- Et enfin, la fermentation du glycogène est opérée par 99 % des souches de *gravis* et 3 % des souches de *mitis/belfanti*. C'est par ce dernier critère que la galerie différencie les biovars (33).

Vitek®

L'automate Vitek®2 permet l'identification de nombreuses espèces bactériennes, de façon automatisée, à partir de caractères biochimiques. Le système repose sur l'utilisation de cartes comprenant plusieurs puits contenant chacun des substrats différents. Une suspension bactérienne est inoculée dans l'ensemble des puits. Lorsque la bactérie consomme le substrat, la réaction chimique fait changer le pH et le puits change de couleur grâce à un indicateur coloré. Une lecture optique est alors réalisée, objectivant ou non une réaction. L'utilisation de la carte appropriée est primordiale pour obtenir des résultats interprétables. Dans la gamme de cartes proposée par BioMérieux®, la carte « GP », utilisée pour identifier les bactéries Gram positives, ne permet pas d'identifier de corynebactéries. La carte « ANC » utilisée pour les anaérobies et corynebactéries, permet d'identifier l'espèce *C. diphtheriae* mais ne différencie pas les biovars (34).

Maldi-TOF

La technologie matrix-assisted laser desorption ionisation - time of flight - mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) est utilisée pour identifier les bactéries jusqu'au niveau de l'espèce. La souche à identifier est déposée sur une cible puis recouverte d'une matrice qui cristallise l'ensemble. Puis un laser vient fragmenter la bactérie en plusieurs protéines qui seront ionisées positivement. Les protéines chargées sont ensuite accélérées dans un champ électrique. Les différentes particules générées lors de cette ionisation sont ensuite séparées en fonction du « temps de vol » ou « time of flight » (TOF), lui-même fonction du rapport masse/charge de chaque fragment : les grosses molécules se déplaçant plus lentement que les petites. La détection des fragments protéiques est effectuée par un spectromètre de masse (SM), qui va générer un spectre composé de pics correspondants à chaque fragment détecté. Le spectre obtenu est comparé à une base de données. En fonction du score de fiabilité entre le spectre obtenu et le spectre de la banque de données, une identification est proposée. Une bactérie sera donc d'autant plus facilement identifiable que le nombre de spectres correspondant à cette bactérie est important dans la base de données. Une bactérie ne sera pas identifiée si son spectre de référence n'est pas présent dans la base de données du spectromètre. À titre d'exemple, la base de données Bruker® utilisée au CHT contient cinq spectres différents de *C. diphtheriae* dont un *mitis*, un *gravis*, un *belfanti* et deux *C. diphtheriae spp.* L'espèce *C. rouxii* pourrait être identifiée par cette technique, grâce à un pic spécifique dans le spectre, si le spectre était rajouté à la base de données (23).

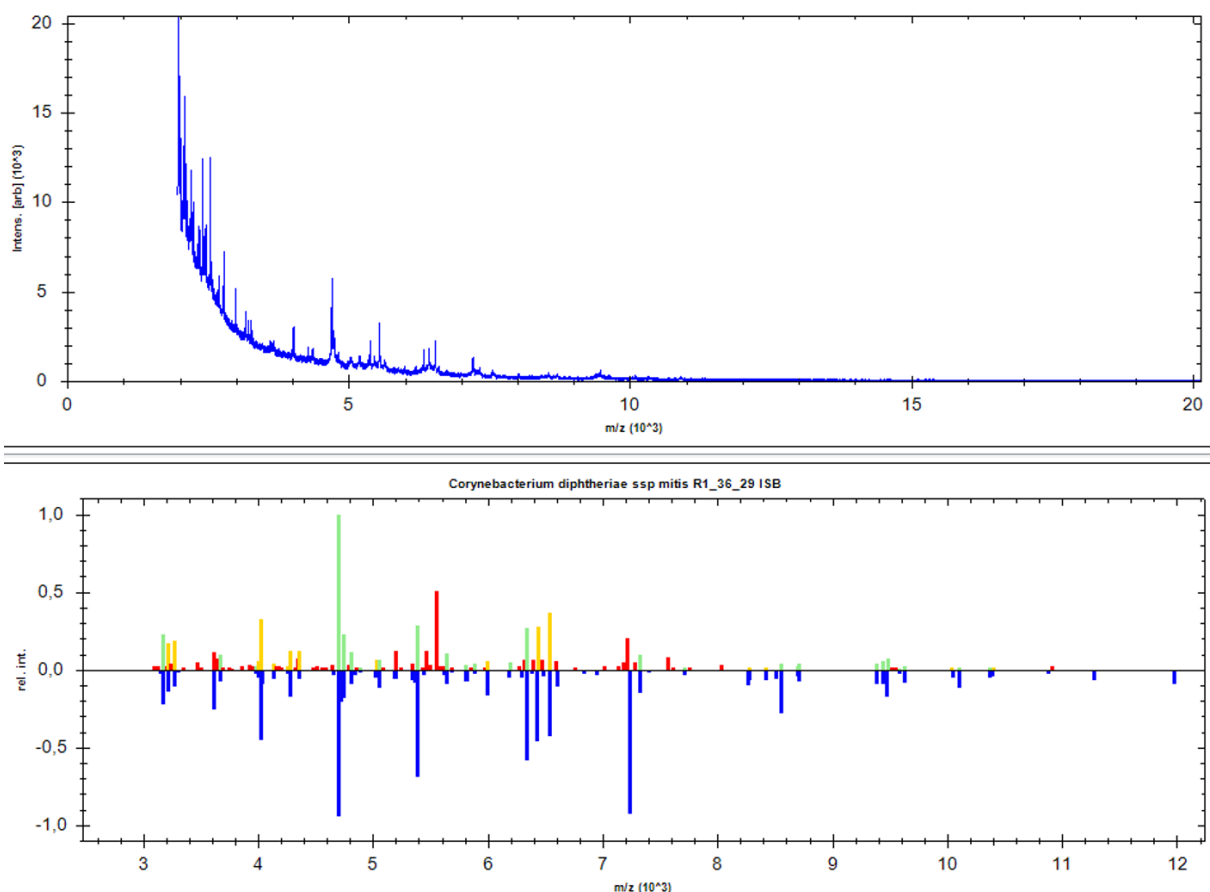


Figure 9 : Spectre d'identification d'une souche de *C. diphtheriae*.

Cette technique a révolutionné la pratique de la bactériologie, accélérant et améliorant considérablement le rendu des identifications, ceci pour d'un nombre très important d'espèces (plus de 2 000 espèces, 5 000 spectres différents).

1.2.5.4 Antibiogramme

Bêtalactamines

Le niveau de sensibilité des corynebactéries aux bêtalactamines est généralement le même pour toutes les molécules de la classe. On évalue habituellement cette sensibilité en étudiant la pénicilline G et l'amoxicilline ou l'ampicilline. Parmi les corynebactéries, *C. diphtheriae* est à classer dans le groupe de sensibilité naturelle modérée à la pénicilline G, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) moyennes de 0,25 mg/L. De plus, une tolérance vis-à-vis de la pénicilline G a été montrée pour certaines souches avec des rapports concentration minimale bactéricide (CMB)/CMI > 32 pour 71 % des souches étudiées. Ces souches n'ont pas forcément des CMI plus élevées (35). Des CMI supérieures à 1 mg/L sont rares (sur 195 souches canadiennes étudiées, aucune n'est retrouvée avec une CMI supérieure à 1 mg/L (36)) et les mécanismes et supports génétiques intervenant dans de telles résistances ne sont pas élucidés (37).

Macrolides

En cas d'allergie aux bêta-lactamines, les macrolides sont indiqués en seconde intention. L'érythromycine a une bonne activité naturelle avec une CMI moyenne de 0,015 mg/L pour *C. diphtheriae*. L'azithromycine présente des CMI supérieures de deux dilutions en moyenne. La clindamycine et la lincomycine ont une activité similaire à celle de l'érythromycine sur la plupart des espèces corynéformes. La résistance aux macrolides est plus souvent observée que celle à la pénicilline. La résistance à l'érythromycine a été décrite comme portée par des plasmides, ayant des homologies de séquences avec les plasmides portés par les corynebactéries commensales de la peau (38). En particulier, le plasmide pNG2 porteur du gène *erm(X)* codant pour une méthylase responsable d'un phénotype de type macrolides, lincosamides, streptogramines B (MLS_B) a été décrit (37,39–41).

Tétracycline

La sensibilité naturelle des corynebactéries à la tétracycline est bonne. Une résistance à cet antibiotique peut néanmoins être retrouvée de manière importante dans certaines études (42–44). Les gènes *tetW*, *tet33* et *tetO* ont été retrouvés et corrélés à une résistance à la tétracycline (45). Les gènes *tet33* et *tetZ* permettraient l'efflux de l'antibiotique (46,47). Les gènes *tetW* et *tetO* coderaient pour des protéines permettant de protéger le ribosome de l'action de la tétracycline (48).

Autres antibiotiques

Les CMI des aminosides sont naturellement basses vis-à-vis des espèces du genre *Corynebacterium*. Il semble qu'il y ait peu de différence d'activité entre les différents aminosides utilisés en thérapeutique.

La majorité des espèces du genre *Corynebacterium* ont une bonne sensibilité naturelle à la ciprofloxacine (CMI inférieures à 0,12 mg/L).

La sensibilité naturelle des corynebactéries à la rifampicine est très bonne, (CMI moyenne inférieures à 0,03 mg/L) (49).

1.2.5.5 Sérologie

Les tests utilisés sont des tests de séro-neutralisation ou immuno-enzymatique de type « enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA). Ils permettent surtout de déterminer le statut vaccinal et le niveau de protection. Ils ne sont pas utilisés dans la stratégie diagnostique.

Les tests TQS (Tétanos Quick Stick) sont régulièrement utilisés aux urgences pour évaluer l'état immunitaire vis-à-vis du tétanos lorsque le patient se présente avec une plaie potentiellement souillée par de la terre ou des végétaux et n'est pas capable de fournir la date de ses derniers rappels vaccinaux avec le vaccin combiné tétanos diphtérie poliomyélite (DTP).

La vaccination contre le tétanos étant combinée à celle contre la diphtérie, l'utilisation de ce test permet d'extrapoler et de supposer que la personne a déjà reçu des doses de vaccin contre la diphtérie. D'usage simple et rapide, il permet de réaliser des rappels vaccinaux aux personnes ne se souvenant plus de leur dernier rappel DTP et présentant un test négatif.

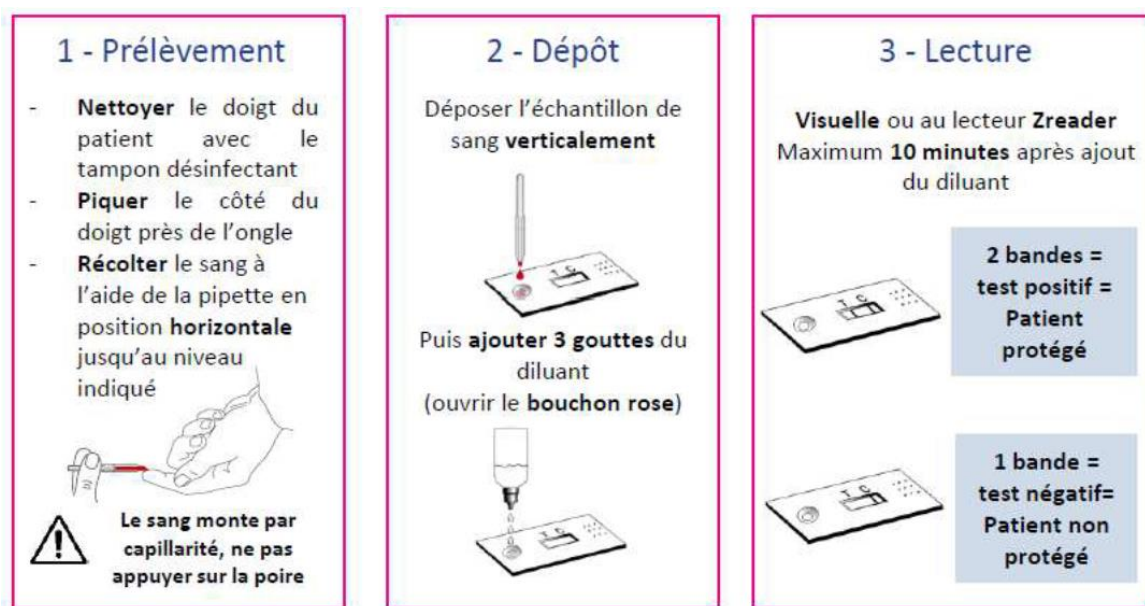


Figure 10 : Utilisation du test TQS.

1.2.6 Biologie moléculaire

1.2.6.1 Typage des souches

Génétiquement, les souches de *C. diphtheriae* sont très diverses. Plusieurs approches ont été étudiées pour permettre de classer les souches entre elles, de les « typer ». Avant l'arrivée de la biologie moléculaire, les souches étaient classées en 4 biovars, ce qui n'était pas assez fin pour permettre des études épidémiologiques lors d'épidémies et pas assez exact du point de vue phylogénétique. En effet, la division en biovars s'effectue sur des critères biochimiques. La perte ou l'acquisition d'un gène décisif dans le métabolisme bactérien peut donc changer les caractéristiques biochimiques de la souche et donc son biovar. Par exemple, il a été montré expérimentalement chez *Streptococcus pneumoniae* que le gène *spuA* code pour une enzyme impliquée dans la fermentation du glycogène (50). Ce même gène est retrouvé chez *C. diphtheriae* et aurait la même fonction (51). Au sein d'une même lignée, il suffit donc de l'acquisition ou de la perte d'expression de ce gène pour classer deux souches dans des biovars différents alors même qu'elles étaient liées. Pour obtenir de meilleures performances, plusieurs techniques ont été utilisées au fil des découvertes scientifiques et des progrès techniques.

Le ribotypage est une technique basée sur l'utilisation d'enzymes de restriction sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien. Les fragments obtenus sont déposés sur un gel d'électrophorèse et séparés lors de la migration. Une dernière étape d'hybridation avec des sondes (marqueur froid ou chaud) spécifiques des régions codantes pour l'acide ribonucléique (ARN) ribosomal permet de révéler le gel. Cette technique aboutit à la détermination de ribotypes. Elle est maintenant moins utilisée.

Le 7-genes-MLST est une technique qui a été beaucoup utilisée mais qui a aujourd'hui ses limites, car elle ne prend en considération que sept gènes. Elle aboutit à la détermination de séquence type (ST). Cette technique consiste à séquencer entièrement 7 gènes de ménage : gènes stables, indispensables à la bactérie et conservés dans l'ensemble des souches de l'espèce à étudier, pour l'ensemble des bactéries à typer. Pour chaque gène, on définit différents allèles en fonction des mutations retrouvées. La combinaison des 7 allèles portés par la bactérie permet de déterminer son ST.

Le séquençage du génome entier ou « Whole Genome Sequencing » (WGS) a un pouvoir de résolution plus élevé. Pour utiliser les données de ce séquençage complet pour typer les souches entre elles, la technique *core genome MLST* (cgMLST) s'avère performante et a été choisie dans cette étude. Elle est décrite dans la partie « Matériel et méthode ».

Cette technique aboutit à la détermination de plusieurs lignées : les lignées *mitis* et *gravis* et de sous-lignées ou sublineages (SL). Le seuil choisi pour le sublineage est de 500 allèles différents, ou 500 « mismatches ». Chaque sublineage (SL) a été nommé en fonction du ST prédominant qu'il inclut, pour permettre une comparaison des données obtenues avec la méthode 7-genes-MLST. Au sein de chaque sublineage, un découpage plus fin au seuil de 25 mismatches permet de définir des « genetic cluster », souches très proches génétiquement et appartenant probablement aux mêmes chaînes de transmission (52).

Une autre technique, encore plus discriminante mais moins reproductible pour des souches génétiquement éloignées, est la technique Single Nucléotide Polymorphism (SNP). Elle permet une étude plus fine des différences entre deux souches et est complémentaire de la méthode précédente.

1.2.6.2 *spuA* et biovar *gravis*

Une corrélation semble être retrouvée lors d'analyses bio-informatiques entre la présence du gène *spuA* ou DIP0357 et le biovar *gravis*. En effet, ce gène permettrait la fermentation du glycogène (50,51), son expression classerait donc phénotypiquement la souche en *gravis* (51). Ce gène serait transmis de manière verticale dans l'embranchement *gravis*, mais des transmissions horizontales à des souches de la lignée *mitis* leur donneraient un phénotype *gravis*. À l'inverse, ce gène ou son expression seraient parfois endommagés pour certaines souches de lignée *gravis*, leur donnant un phénotype *mitis*. Ces hypothèses reposent sur des analyses bio-informatiques et n'ont pas été prouvées expérimentalement.

1.2.6.3 *narG* et biovar *belfanti*

Le groupe de gènes *narKGHJI* serait impliqué dans la réduction des nitrates, caractéristique biochimique différenciant le biovar *belfanti* (nitrate négatif) des autres biovars (45). Parmi ces gènes, le gène *narG* coderait pour une nitrate réductase (sous-unité alpha), *narK* coderait pour un transporteur de nitrates, *narH* et *narI* coderaient pour des séquences permettant la réduction grâce à la présence d'ions fer notamment, *narJ* permettrait l'assemblage du complexe des différentes protéines. L'ensemble permettrait à une souche de réduire les nitrates (51). Ces hypothèses reposent sur des analyses bio-informatiques et n'ont pas été prouvées expérimentalement.

1.2.7 Toxine

C. diphtheriae ne possède pas naturellement le gène *tox*. Seules les souches infectées par le corynebactériophage β possèdent le gène *tox* permettant la production de la toxine. Ces souches sont dites positives pour la présence du gène *tox*, ou *tox+*.

1.2.7.1 Structure de la toxine

La toxine diphtérique est un polypeptide simple de 535 acides aminés et d'environ 60 kDa (kilo Dalton).

C'est une toxine de type AB_{RTC}, c'est-à-dire organisée en trois domaines structuraux distincts :

- Le domaine R, C terminal, est composé de neuf feuillets β et est responsable de la liaison de la toxine à son récepteur cellulaire.
- Le domaine T, situé entre les domaines R et C, est composé de neuf hélices α et est responsable de la translocation de la toxine.
- Le domaine C, N terminal, composé de sept hélices α et deux feuillets β , porte l'activité catalytique adénosine diphosphate (ADP) ribosyl transférase.

Le domaine C forme le fragment A. Les domaines R et T forment le fragment B.

La toxine contient quatre cystéines (acide aminé comportant un atome de soufre), formant deux ponts disulfures, C₁₈₆-C₂₀₁ et C₄₆₁-C₄₇₁. Le premier relie le domaine C au domaine T (ou sous-unité A à la sous-unité B), le deuxième est intra-caténaire au domaine R.

La toxine est excrétée de la cellule bactérienne et subit un clivage en deux chaînes A et B, qui sont liées par un pont disulfure entre des résidus cystéine aux positions 186 et 201.

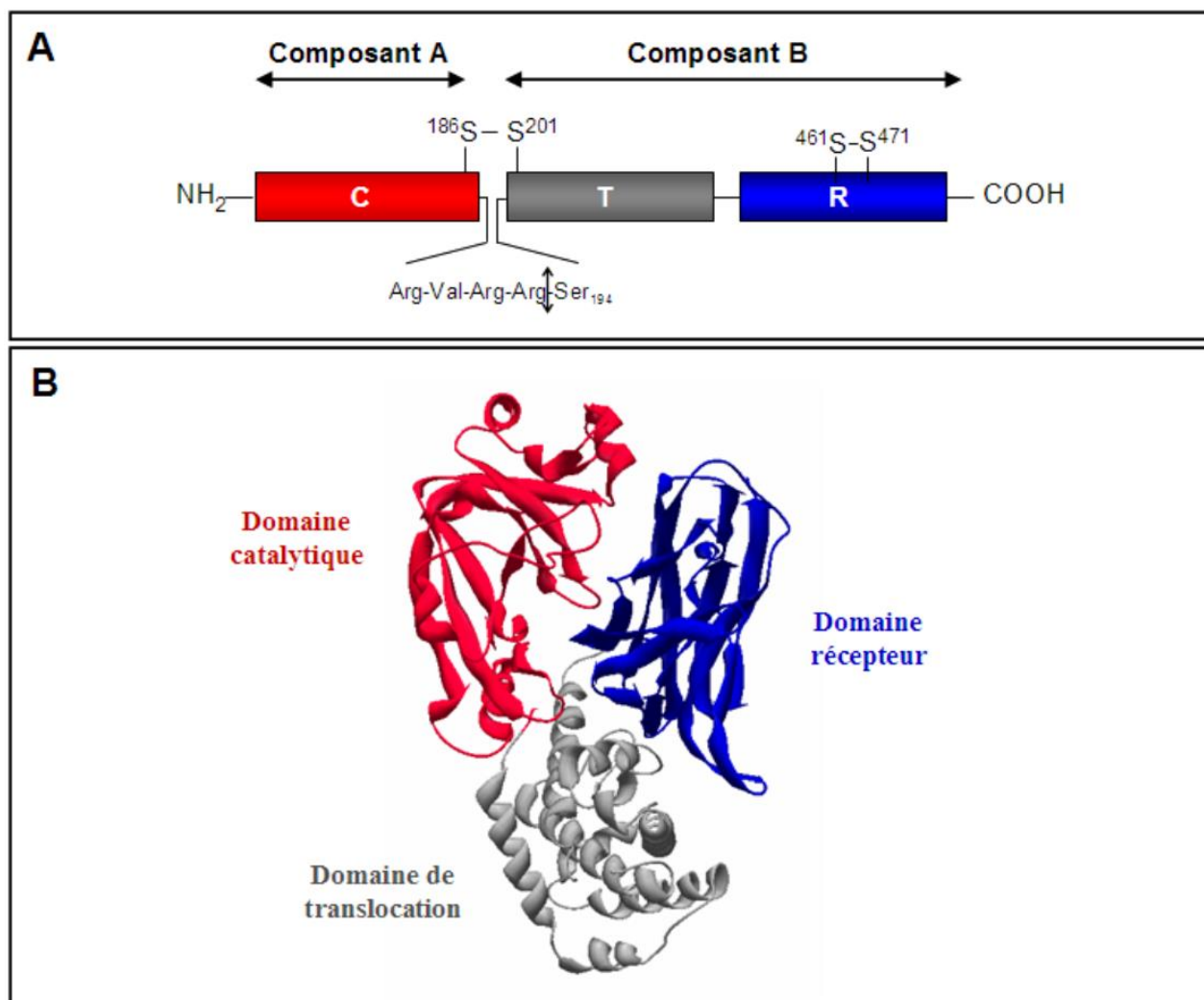


Figure 11 : Structure de la toxine diphtérique. (A) Représentation schématique des trois domaines structuraux. Le site de clivage de la furine entre les deux fragments A et B est représenté par une flèche. (B) Structure tridimensionnelle de la toxine diphtérique (17).

1.2.7.2 Mécanisme d'action de la toxine :

- Liaison de la toxine à son récepteur cellulaire le pro-heparin-binding epidermal growth factor (proHB-EGF). L'antigène de surface CD9 augmente la capacité du récepteur à lier la toxine diphtérique (DT)
- Endocytose par la voie clathrine dépendante. La toxine transite dans les endosomes précoces, tardifs et lysosomes avec une acidification progressive entre ces différents stades.

L'acidification désolidarise la toxine de son récepteur et favorise l'interaction du domaine T avec la membrane du lysosome.

- Translocation du domaine C.
- Libération du domaine C dans le cytosol.
- ADP ribosylation de l'élongation factor 2 (EF2) en présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) et donc inhibition de la synthèse des protéines (traduction).

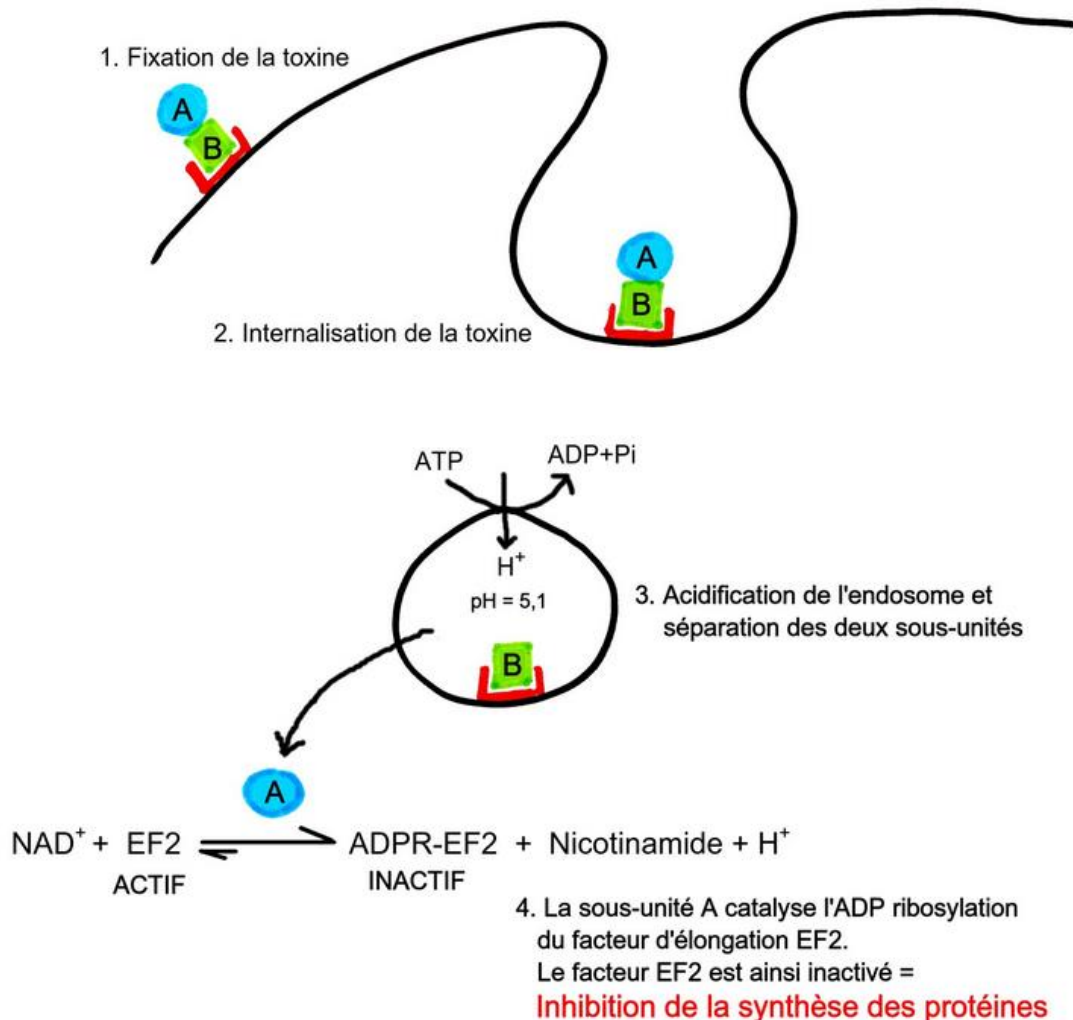


Figure 12 : Mode d'action de la toxine diphtérique (53).

La translocation d'une seule molécule de DT suffit à bloquer totalement la synthèse protéique et aboutit à la mort cellulaire (54).

Les souches toxigènes portent le gène *tox* présent dans les corynebactériophages β *tox*⁺

L'expression des gènes *tox* est régulée par le taux de fer. En présence d'une faible concentration en fer, le gène régulateur est inhibé, ce qui provoque l'augmentation de la production de la toxine (17). Le fer agit donc comme co-répresseur sur la synthèse de la toxine.

La toxine diphtérique n'a pas d'organe cible spécifique, mais le myocarde et les nerfs périphériques sont les plus affectés.

1.2.7.3 Titrage de la toxine diphtérique

In vivo, la toxine diphtérique peut être dosée par rapport à son pouvoir létal. Il est ainsi possible de déterminer une dose minimale mortelle (DMM) et une dose létale 50 (DL50). Ces doses sont déterminées par titrage en cultures cellulaires.

In vitro, la méthode de référence est le titrage de Ramon qui permet de déterminer l'indice de floculation ou limit of floculation (Lf) d'un échantillon. Il est déterminé par le nombre d'unités d'antitoxine qui, mélangées à l'échantillon, produisent un mélange floculant maximal.

1.2.7.4 Autres facteurs de virulence :

Le facteur de virulence « ribosomal binding protein » ou rbp, est une protéine comportant des homologies de séquences avec la chaîne A de shiga like toxine-1 (SLT-1) présente chez *E. coli*, en particulier au niveau du site catalytique portant l'activité *N*-glycosidase. Ce facteur de virulence a été découvert initialement chez *C. ulcerans* (55).

1.2.8 Traitement

1.2.8.1 Symptomatique

L'obstruction des voies respiratoires peut en cas d'extrême urgence (ou historiquement) être traitée par trachéotomie. Néanmoins, la technique est maintenant abandonnée au profit de l'intubation (56).

Pour ce qui est des atteintes cutanées, le traitement local et mécanique reste primordial associé à une antibiothérapie active sur la diphtérie mais aussi sur les espèces co-responsables de l'infection. Si le germe associé est *Streptococcus pyogenes*, un traitement adapté serait par exemple l'amoxicilline. En cas d'isolement de *S. aureus*, le traitement sera à adapter en fonction de l'antibiogramme, l'association amoxicilline-acide clavulanique pour les *S. aureus* sensibles à la méticilline et la clindamycine pour les *S. aureus* résistants à la méticilline par exemple. En pédiatrie, l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole sera préférée pour ce dernier cas de figure.

Les infections invasives (comme les endocardites par exemple) sont traitées en fonction de l'organe touché et peuvent faire intervenir des techniques mécaniques ou chirurgicales, associées à l'antibiothérapie. La prise en charge dépendra de l'organe touché.

1.2.8.2 Spécifique

Le sérum antidiphtérique contient des anticorps antitoxine diphtérique obtenus à partir de sérums de chevaux qui ont été immunisés contre la toxine diphtérique. Ce sérum neutralise donc la toxine circulante, prévenant ainsi son action.

Le sérum n'agit que sur la toxine libre et non celle déjà fixée sur les tissus. C'est pourquoi la rapidité d'administration est primordiale. En cas de forte suspicion clinique, son administration ne doit pas attendre les résultats des tests microbiologiques et l'identification bactérienne. Elle sera de préférence par voie intraveineuse (IV). La voie intramusculaire peut être utilisée dans les formes légères, le produit doit être réchauffé à 32-34°C avant utilisation (57).

Il existe un risque de réaction anaphylactique en particulier chez les personnes ayant déjà reçu un sérum d'origine équine. La tolérance du sérum doit donc être testée avant administration, par la technique de Besredka : injection par voie sous-cutanée de 0,1 mL de sérum puis 15 minutes plus tard 0,25 mL. En absence de réaction dans le quart d'heure, la totalité de la dose peut être administrée, par doses croissantes pour créer une tolérance immune.

Bien que listé comme traitement essentiel par l'OMS, l'accès au sérum antidiphtérique est compliqué, que ce soit dans un but thérapeutique ou diagnostique. En effet la production est limitée et la demande faible (diminution de l'incidence de la diphtérie, augmentation de la vaccination). Seuls quelques pays (L'Inde en particulier) produisent actuellement ce médicament (26). C'est pourquoi en France, son utilisation est soumise à une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative.

Cette sérothérapie n'est pas disponible en Nouvelle-Calédonie, à cause des difficultés d'approvisionnement et de logistique, d'une péremption trop courte et d'un contexte qui ne le justifie pas (peu de souches porteuses de la toxine diphtérique, population très bien vaccinée).

1.2.8.3 Antibiothérapie

Le traitement de choix est l'amoxicilline *per os* pendant 14 jours, par voie IV pour les cas les plus graves ou si impossibilité d'utiliser la voie orale. Si la personne à traiter est allergique, il est possible de prescrire un macrolide : par voie orale, l'azithromycine est généralement utilisée pendant trois jours, par voie IV c'est la spiramycine (ou érythromycine si non disponible) qui est privilégiée.

La vaccination du patient doit être effectuée s'il n'est pas à jour, car la maladie est peu immunisante.

1.2.9 Prophylaxie

1.2.9.1 Prophylaxie primaire

La vaccination contre la diphtérie est obligatoire en France depuis la loi du 25 juin 1938 et effective à partir de 1945. La primovaccination comporte une injection à deux mois et une à quatre mois, suivie d'un rappel à onze mois. Des rappels sont effectués à l'âge de 6 ans puis entre 11 et 13 ans. Chez l'adulte, les rappels se font à vingt-cinq, quarante-cinq et soixante-cinq ans, puis tous les dix ans. À partir de 11 ans, le vaccin est composé d'une anatoxine à faible concentration (1/10^{ème} de la dose) (58).

Le vaccin est composé d'une anatoxine diphtérique, obtenue par traitement de la toxine par le formol ou formaldéhyde, adsorbé sur hydroxyde d'aluminium (adjuvant) pour la rendre plus immunogène. Le vaccin protège donc contre les manifestations toxiques qui font la gravité de la maladie. Il est associé à d'autres valences, en particulier le tétanos, la poliomyélite, la coqueluche, l'hépatite B et *Haemophilus influenzae* B.

1.2.9.2 Prophylaxie secondaire

La prévention autour d'un cas de diphtérie passe par l'isolement du patient, la détection rapide des cas et de leurs contacts humains et leur prise en charge immédiate : revaccination si non à jour et antibiothérapie préventive si le risque est élevé.

La diphtérie est une maladie à déclaration obligatoire (MDO) : toutes les souches porteuses du gène *tox* doivent être déclarées. La surveillance de la diphtérie s'est étendue en 2003 aux infections dues aux bactéries *Corynebacterium ulcerans* transmises à l'homme par le lait cru ou les animaux de compagnie et *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmises par les caprins et ovins. Ces bactéries peuvent également produire la toxine diphtérique (59).

Doivent être signalées :

- Toute suspicion clinique de diphtérie ORL avec fausses membranes. Un cas sera suspecté devant toute angine à fausses membranes extensives survenant notamment chez un sujet résidant ou en provenance d'une zone d'endémie (ou en contact avec un sujet revenant d'une zone d'endémie) ou chez un sujet aux conditions de vie précaires. Un antécédent de vaccination ne doit pas faire rejeter le diagnostic. En l'absence d'extension des fausses membranes en dehors des amygdales, la clinique et la biologie peuvent aider à différencier diphtérie et mononucléose infectieuse.
- Toute diphtérie cutanée avec fausses membranes et présence de corynebactéries du complexe *diphtheriae*.
- Toute diphtérie avec présence de corynebactéries du complexe *diphtheriae* (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*) porteuses du gène *tox* (*tox+*) (60).

République française

Médecin ou biologiste déclarant (tampon)	Si notification par un biologiste
Nom :	Nom du clinicien :
Hôpital/service :	Hôpital/service :
Adresse :	Adresse :
Téléphone :	Téléphone :
Télécopie :	Télécopie :
Signature :	



Important : cette maladie justifie une intervention urgente locale, nationale ou internationale. **Vous devez la signaler par tout moyen approprié (téléphone, télécopie...)** au médecin de l'ARS avant même confirmation par le CNR ou envoi de cette fiche.

Initiale du nom : Prénom : Sexe : M F Date de naissance :

Code d'anonymat : (A établir par l'ARS) Date de la notification :

Code d'anonymat : (A établir par l'ARS) Date de la notification :

Sexe : M F Année de naissance : Département du domicile du patient :

Date des premiers signes cliniques : Porteur asymptomatique

Terrain particulier :

Hospitalisation : oui non Date :

Evolution : guérison encore malade décès sans objet
 séquelles, préciser :

Diphthérie
<small>Critères de notification : isolement de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>, <i>ulcerans</i> ou <i>pseudotuberculosis</i> ET mise en évidence du gène codant la toxine diphthérique (recherche à demander en URGENCE au Centre national de référence des Corynebactéries à l'Institut Pasteur de Paris).</small>

Confirmation du diagnostic (cas clinique ou isolement chez un porteur asymptomatique) :

Date d'isolement : Nature du prélèvement :
Nom et adresse du laboratoire de la première identification :
Espèce de *Corynebacterium* (*C.*) identifiée : *C. diphtheriae* *C. ulcerans* *C. pseudotuberculosis* autre, préciser :
Mise en évidence du gène codant la toxine : oui non en cours Test Elek : positif négatif ne sait pas

Antécédents vaccinaux :

Le sujet a-t-il reçu dans le passé une vaccination antidiphthérique complète (≥3 doses) : oui non inconnu
Date de la dernière dose :

Notion de contagion : oui non

Si oui : Voyage récent en zone d'endémie Pays visité : Retour en France le :
 Contact avec un sujet revenant de zone d'endémie Pays visité :
 Contact avec un cas
 Autre, préciser les circonstances :

Si isolement de *C. ulcerans* ou de *C. pseudotuberculosis* :

Contact avec des animaux (chien, chat, cheval, chèvre, autre) : oui non Si oui, préciser l'espèce animale concernée :
Investigation vétérinaire mise en place : oui non

Surveillance et prophylaxie des sujets contacts (se reporter aux recommandations officielles de la conduite à tenir) :

Nombre de personnes	En milieu familial	En collectivité
Exposées (contacts proches)	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Ayant reçu une antibioprofylaxie	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Prélevées	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Présentant un résultat positif	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Médecin ou biologiste déclarant (tampon)	Si notification par un biologiste	ARS : (signature et tampon)
Nom :	Nom du clinicien :	
Hôpital/service :	Hôpital/service :	
Adresse :	Adresse :	
Téléphone :	Téléphone :	
Télécopie :	Télécopie :	
Signature :		

Maladie à déclaration obligatoire (Art L 3113-1, R 3113-1, R 3113-2, R 3113-5, D 3113-7 du Code de la santé publique)
Information individuelle des personnes - Droit d'accès et de rectification pendant 6 mois par le médecin déclarant (loi du 6 janvier 1978) - Centralisation des informations à l'Institut de veille sanitaire

Figure 13 : Cerfa de déclaration (61).

1.2.10 Mesures d'hygiène et de santé publique

Le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) a édité des recommandations en 2011 sur la conduite à tenir lors de la détection d'un cas de diphtérie (60).

1.2.10.1 Pour le cas index :

Dès suspicion clinique (ou dès que *C. diphtheriae tox+* a été isolée pour les cas non symptomatiques ou non évocateurs), des précautions respiratoires de type gouttelettes seront mises en place. Si l'atteinte est cutanée, la plaie doit être couverte et des précautions de type contact seront appliquées. L'isolement respiratoire n'est dans ce cas pas obligatoire mais un prélèvement de gorge sera réalisé afin de mettre en évidence un portage. Les précautions sont maintenues jusqu'à ce que deux prélèvements (à 24 heures d'intervalle au moins) soient revenus négatifs. Des prélèvements de contrôle seront effectués après au moins 24 heures d'arrêt de l'antibiothérapie, soit à J15 et J16 pour une antibiothérapie de 14 jours d'amoxicilline, ou à J7 et J8 pour une antibiothérapie de 3 jours d'azithromycine. En raison de rechutes bactériologiques précoces, un prélèvement à J30 est également recommandé. Tous les objets en contact avec le patient doivent être désinfectés.

L'antibiothérapie doit être débutée immédiatement après la réalisation des prélèvements, ou dès que la bactérie a été isolée au laboratoire. Cette antibiothérapie peut être administrée par voie orale ou IV en fonction de la gravité du cas (voie orale à privilégier si possible). Les antibiotiques, voies d'administration et posologies recommandées sont synthétisées dans le tableau 3. Le traitement probabiliste est à réévaluer en fonction des données de l'antibiogramme.

Antibiotiques	Adulte (Posologies quotidiennes établies pour un adulte à la fonction rénale normale)	Enfant (Posologies quotidiennes établies pour un enfant à la fonction rénale normale, sans dépasser la dose adulte)
Bêta-lactamines		
Amoxicilline		
<i>voie injectable IV</i>	3 g/jour en 3 injections - en IV directe lente de 3 à 4 minutes sans dépasser 1 g à la fois ; - ou en perfusions de 30 à 60 minutes sans dépasser 2 g à la fois.	100 mg/kg/jour en 3 injections - en IV directe lente de 3 à 4 minutes sans dépasser 25 m/kg à la fois ; - ou en perfusions de 30 à 60 minutes sans dépasser 50 m/kg à la fois.
<i>voie orale</i>	3 g/jour en 3 prises	100 mg/kg/jour en 3 prises
Macrolides en cas d'allergie aux bêta-lactamines		
<i>voie injectable IV</i>		
Spiramycine	9 MUI/jour en perfusions de 60 minutes	150 000 UI/kg/jour en perfusions de 60 minutes (hors AMM)
Erythromycine (en cas d'indisponibilité de la spiramycine)	3 à 4 g/jour - en perfusion continue sur 24 heures ; -ou en 3 ou 4 perfusions de 60 minutes.	30 à 40 mg/kg/jour, -en perfusion continue sur 24 heures ; -ou en perfusions de 60 minutes 4 fois par jour
<i>voie orale</i>		
Azithromycine	500 mg/jour en 1 prise	20 mg/kg/jour en 1 prise (hors AMM)
Clarithromycine (standard)	500 mg à 1 g/jour en 2 prises	15 mg/kg/jour en 2 prises
Clarithromycine (libération modifiée)	500 mg à 1 g/jour en 1 prise	
Erythromycine	2 à 3 g/jour en 2 à 3 prises	30 à 50 mg/kg/jour en 2 à 3 prises
Josamycine	1 à 2 g/jour en 2 prises	50 mg/kg/jour en 2 prises
Roxithromycine	300 mg/jour en 2 prises	5 à 8 mg/kg/jour en 2 prises
Spiramycine	6 à 9 MUI/jour en 2 à 3 prises ⁵	150 000 à 300 000 UI/kg/jour en 2 à 3 prises

Tableau 3 : Schémas d'administration préconisés pour les antibiotiques recommandés en cas de diphtérie (60).

La mise en place d'une éventuelle sérothérapie doit être évoquée si elle est possible en suivant les recommandations en vigueur.

La diphtérie étant une maladie peu immunisante, la vaccination antidiphtérique doit être systématique en phase de convalescence. Une dose de valence D sera administrée aux enfants, de valence d pour les adultes, sauf si le schéma vaccinal est documenté et à jour et que la dernière vaccination remonte à moins de cinq ans.

1.2.10.2 Pour les cas contacts :

Toutes les personnes ayant été en contact rapproché avec le cas index dans les 7 jours précédant le début des symptômes sont à risque. Cette définition comprend : les membres d'une même famille vivant sous le même toit, les passagers étant restés assis à côté plusieurs heures dans les transports en commun, le personnel de santé ayant été exposé aux sécrétions... Si l'atteinte est uniquement cutanée, les contacts proches se résument aux personnes en contact avec la plaie : famille vivant sous le même toit et personne ayant effectué des soins locaux (pansements).

Tous ces contacts doivent faire l'objet d'une surveillance clinique pendant les 7 jours suivant l'arrêt du contact avec le cas index, à la recherche de symptômes ORL ou cutanés. Un prélèvement microbiologique a minima au niveau ORL est également préconisé, avant la mise en place de l'antibioprophylaxie. La durée de cette antibioprophylaxie est de 7 à 10 jours sauf pour l'azithromycine où la durée est de trois jours. Les molécules et posologies recommandées sont synthétisées dans le tableau 4.

Antibiotiques* (voie orale)	Adulte (Posologies quotidiennes établies pour un adulte à la fonction rénale normale)	Enfant (Posologies quotidiennes établies pour un enfant à la fonction rénale normale, sans dépasser la dose adulte)
Bêta-lactamines		
Amoxicilline	3 g/jour en 3 prises	100 mg/kg/jour en 3 prises
Macrolides en cas d'allergie aux bêta-lactamines		
Azithromycine	500 mg/jour en 1 prise	20 mg/kg/jour en 1 prise (hors AMM)
Clarithromycine (standard)	500 mg à 1 g/jour en 2 prises	15 mg/kg/jour en 2 prises
Clarithromycine (libération modifiée)	500 mg à 1 g/jour en 1 prise	
Erythromycine	2 à 3 g/jour en 2 à 3 prises	30 à 50 mg/kg/jour en 2 à 3 prises
Josamycine	1 à 2 g/jour en 2 prises	50 mg/kg/jour en 2 prises
Roxithromycine	300 mg/jour en 2 prises	5 à 8 mg/kg/jour en 2 prises
Spiramycine	6 à 9 MUI/jour en 2 à 3 prises	150 000 à 300 000 UI/kg/jour en 2 à 3 prises

MUI : Million d'unités internationales

Tableau 4 : Schémas d'administration préconisés pour l'antibioprophylaxie de la diphtérie (60).

Pour ce qui est des cas où *C. diphtheriae* ne possède pas le gène de la toxine, ils ne donnent pas lieu à une déclaration obligatoire. Le cas index est traité par antibiothérapie comme ce qui est recommandé pour les souches *tox+*. Il n'y a pas d'antibioprophylaxie systématique des cas contacts, mais l'identification de cas symptomatique dans l'entourage familial doit conduire à des prélèvements s'il est retrouvé une atteinte ORL ou cutanée.

Les deux tableaux 5 et 6 résument la conduite à tenir en fonction du type d'atteinte, du germe isolé et de son statut toxinique.

Conduite à tenir si atteinte cutanée, selon l'espèce de corynebactérie et le gène *tox*.

Atteinte cutanée	<i>C. diphtheriae</i>		<i>C. ulcerans</i>	
	<i>tox</i> +	<i>tox</i> -	<i>tox</i> +	<i>tox</i> -
Cas index				
Antibiothérapie	oui	oui	oui	oui
Sérothérapie ¹	oui	non	oui	non
Vaccination ²	oui	oui	oui	oui
Isolement respiratoire	non	non	non	non
Contrôle microbiologique ³	oui	oui	oui	oui
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Signalement immédiat ARS ➤ Notification 	oui oui	DO non	oui oui	DO non
Recherche contacts animaux	-	-	oui	oui
Sujets contacts du cas⁴				
Antibiothérapie	oui	à discuter selon les cas	oui pour les contacts proches et si culture positive	à discuter selon les cas
Sérothérapie	non	non	non	non
Vaccination	mise à jour selon le calendrier vaccinal			
Isolement respiratoire	non	non	non	non

Tableau 5 : Conduite à tenir lors d'une atteinte cutanée (60).

Conduite à tenir si atteinte ORL, selon l'espèce de corynebactérie et le gène *tox*.

Atteinte ORL	<i>C. diphtheriae</i>		<i>C. ulcerans</i>	
	<i>tox</i> +	<i>tox</i> -	<i>tox</i> +	<i>tox</i> -
Cas index				
Antibiothérapie	oui	oui	oui	oui
Sérothérapie ¹	oui	non	oui	non
Vaccination ²	oui	oui	oui	oui
Isolement respiratoire ³	oui	oui	oui	oui
Contrôle microbiologique ⁴	oui	oui	oui	oui
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Signalement immédiat ARS ➤ Notification 	oui oui	DO non	oui oui	DO non
Recherche contacts animaux	-	-	oui	oui
Sujets contacts du cas⁵				
Antibiothérapie	oui	à discuter selon les cas	oui pour les contacts proches et si culture positive	à discuter selon les cas
Sérothérapie	non	non	non	non
Vaccination	mise à jour selon le calendrier vaccinal			
Isolement respiratoire	non	non	non	non

Tableau 6 : Conduite à tenir lors d'une atteinte ORL (60).

Depuis 2015, tous les cas de *C. diphtheriae* déclarés ont été investigués par la DASS quel que soit le statut toxinique. Depuis la mise en place de la polymerase chain reaction (PCR) en décembre 2017, les enquêtes sont toujours débutées, les cas contacts identifiés, mais le fait d'avoir rapidement la réponse sur le statut toxinique permet d'alléger le travail de la DASS. Les enquêtes, beaucoup moins lourdes lorsque le gène *tox* n'est pas retrouvé, ont pour principal objectif de vérifier que le patient a été bien traité et que les cas contacts sont à jour de leurs vaccinations.

2. Deuxième partie : Matériel et méthode

2.1 Objectifs de l'étude

Le but de cette étude est de décrire de façon rétrospective les situations cliniques relatives à l'isolement de souches de *C. diphtheriae*, leur épidémiologie et de décrire les souches isolées sur le territoire néo-calédonien sur le plan phénotypique et génomique.

Les objectifs secondaires sont d'essayer de trouver une corrélation entre différents paramètres : origine géographique, profil de résistance aux antibiotiques, manifestations cliniques, évolution des souches dans le temps et les données de biologie moléculaire.

2.2 Origine des données et des souches

Les souches proviennent d'isolats cliniques de patients du CHT et ont été analysées et conservées par le Laboratoire de Bactériologie de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC) (souches de 2004 à 2016) et du CHT (souches de 2017 à 2019). D'autres souches ont été transmises par les autres laboratoires du territoire (privés comme publics) dans le cadre du réseau de surveillance en bactériologie (cf. annexe 1 : bon de demande). Dans la grande majorité des cas (sauf oubli), le germe était souché (conservation à -80°C sur place) et envoyé dans un second temps au CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*.

Pour chaque souche enregistrée comme *C. diphtheriae*, les données relatives au cas ont été investiguées. Les données des patients ont pu être ou non retrouvées, en particulier il a été difficile de retrouver des données sur des épisodes datant de plus de 10 ans, quand les dossiers médicaux n'étaient pas informatisés.

2.3 Critères d'inclusion et d'exclusion

L'inclusion a commencé en octobre 2004, date de la mise en place du système informatique du laboratoire (SIL) InLog®. Elle s'est arrêtée le 1^{er} juin 2019, date de début de l'étude.

Ont été inclus l'ensemble des épisodes où le germe *C. diphtheriae* a été soit isolé en culture, soit retrouvé en PCR.

Ont été exclus tous les épisodes extérieurs au territoire de Nouvelle-Calédonie (prélèvement réalisé à Wallis et Futuna par exemple, envoyé au CHT pour réalisation de la PCR de détection de la toxine). En revanche, les cas de diphtérie survenus en Nouvelle-Calédonie après un voyage au Vanuatu

sont inclus dans l'étude. Une souche de *C. diphtheriae* isolée au Vanuatu a également été incluse, car liée épidémiologiquement à cinq autres cas isolés en Nouvelle-Calédonie.

Il n'a pas été retenu de critère clinique d'inclusion ou d'exclusion, bien que la seule réalisation d'un prélèvement bactériologique témoigne d'une atteinte clinique pour la plupart des cas. Certains cas étaient asymptomatiques et uniquement détectés après enquête autour d'un autre cas.

2.4 Clinique et étude des dossiers patients

Une trame de données à recueillir a été réalisée après un entretien avec Sylvain Brisse, directeur du CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae* et Julie Toubiana, clinicienne rattachée à ce même CNR. Nous nous sommes basés sur leur questionnaire d'investigation (cf. annexe 2) pour construire un tableur contenant toutes les données d'intérêt parmi l'ensemble des données disponibles.

Pour chaque patient, une recherche dans les observations médicales enregistrées sur le logiciel de soin DxCare® a été effectuée et les données d'intérêt extraites dans un tableur. Pour les patients non enregistrés dans le logiciel de soin, ou dont l'épisode en question n'était pas renseigné, il a été en plus effectué une recherche au cas par cas :

- Les laboratoires extérieurs ont été contactés pour connaître le prescripteur et remonter jusqu'à l'observation médicale, via des dispensaires ou l'appel de médecins généralistes.
- Le dispensaire de Lifou ayant été à l'origine d'un nombre important de cas, une visite sur place a permis également de récupérer directement les données par la consultation de leur logiciel de soin.
- Enfin, les données récoltées par la DASS lors de chaque enquête épidémiologique autour d'un cas ont également été utilisées et ont permis de compléter les données médicales.

Au final, pour chaque épisode, il a été recherché les données suivantes, anonymisées par la suite :

- En ce qui concerne la souche bactérienne, ont été relevés la référence interne au laboratoire, la référence sous laquelle la souche a été enregistrée au CNR (si elle a été envoyée), la date d'enregistrement de la demande au laboratoire, la date de prélèvement de l'échantillon, sa nature, la localisation anatomique où a été prélevé l'échantillon, le service prescripteur, la présence ou l'absence du gène *tox*, son expression ou non via le résultat du test Elek pour les souches *tox+*, le biovar de la souche, la méthode d'identification de la souche, le caractère pur ou non de l'isolement bactérien avec le nom des bactéries retrouvées dans le cas de prélèvements plurimicrobiens, la sensibilité à l'ensemble des molécules antibiotiques testées.
- En ce qui concerne le patient, ont été relevés les noms, prénoms, date de naissance, sexe, lieux de vie (ville ou campagne, commune, type d'habitat, la présence d'un jardin, de contacts avec les animaux, le nombre de personnes vivant sous le même toit), la profession des patients, la notion de marche pieds nus ou en chaussures/claquettes, la notion de contagion, le pays d'origine des patients, la notion de voyage récent avec les dates du voyage et la destination le cas échéant, la notion de vaccination avec le nombre de doses administrées, la date de la dernière injection, le nom du vaccin administré. Les antécédents médicaux du patient ont également été recherchés : antécédents infectieux, cardiopathies, insuffisance respiratoire chronique, la présence de diabète, d'insuffisance rénale, d'immunodépression.

- Concernant l'épisode, ont été relevés la date de début de survenue des symptômes, le type de symptômes, la date de début de prise en charge médicale, la notion d'hospitalisation et les dates d'hospitalisation. Pour chaque type d'atteinte (cutanée, respiratoire, systémique) les données relevées différaient légèrement.
 - Pour les atteintes cutanées, il a été recherché la présence de membranes, de nécrose, la taille, le type, le nombre de lésions, la date d'apparition des lésions, leur aspect, le type de prélèvement réalisé, la notion de soin de pansement réalisé seul avant la prise en charge médicale, la réponse au traitement.
 - Pour les atteintes respiratoires, ont été relevés la date de début des symptômes, la dysphonie, la présence de membranes, d'adénopathies cervicales, de nécrose, l'état des sinus, des poumons, de la sphère ORL en général, le type de prélèvement réalisé, la défaillance respiratoire, les dyspnées inspiratoires et expiratoires, la ventilation invasive, les besoins en oxygène.
 - Pour les atteintes systémiques, ont été relevés les symptômes, le ou les organes touchés, le type de prélèvement.
- Pour toutes les atteintes, ont également été relevés le traitement mis en place, la notion d'isolement du cas et la date de mise en place de cet isolement, la nécessité de recourir à une assistance d'organe, la notion d'antibiothérapie avec le nom de la molécule, la posologie, la voie d'administration, la durée du traitement, la date de mise en place du traitement, son efficacité, sa tolérance, la sensibilité de la souche à l'antibiotique utilisé, les changements éventuels d'antibiothérapie avec pour chaque ligne les informations précédentes, le décès éventuel du patient et la date de ce décès, l'utilisation de la sérothérapie, la vaccination du cas avec la date de la vaccination, le nom du vaccin utilisé, les effets secondaires, les autres traitements mis en œuvre, les soins prodigués, leur fréquence et durée (pansements en particulier).
- La notion d'examen complémentaire a également été recherchée avec les résultats d'analyses sanguines disponibles (CRP, NFS, fonction rénale, fonction hépatique, la réalisation de sérologies vaccinales), les résultats des examens radiologiques.
- Enfin, il a été recherché la notion de contacts familiaux.

Ce relevé de données se voulait le plus complet et exhaustif possible. Mais s'agissant d'une enquête rétrospective, un nombre important de données manquantes était attendu.

2.5 Investigations autour des cas

Chaque isolement de *Corynebacterium diphtheriae* fait l'objet d'une déclaration à la DASS dès l'identification. Si la souche est isolée par un autre laboratoire que le CHT, la souche est transmise dans les meilleurs délais au CHT pour réalisation de la recherche du gène de la toxine diphtérique. Cette recherche était auparavant réalisée par le CNR et un délai de 10 jours en moyenne était nécessaire pour le résultat. Depuis décembre 2017, la PCR est réalisée sur place, permettant une réponse rapide

(<48 heures) quant au statut toxinique de la bactérie. Dans tous les cas, les agents de la DASS commencent une enquête dès la déclaration. Lors de la déclaration, le laboratoire fournit si possible le numéro de téléphone du patient s'il est en sa possession. Le nom du médecin ou service prescripteur est également communiqué à la DASS. À partir de cette déclaration, l'équipe de la DASS retrace l'histoire de la maladie, les notions de voyage récent et l'ensemble des contacts proches : infirmier(ère) diplômé(e) d'état (IDE) ayant réalisé les pansements, famille ou amis vivant sous le même toit... Pour chaque cas contact identifié, une vérification de l'état vaccinal est demandée et les rappels réalisés si besoin. Il est demandé aux IDE de porter gants et masques chirurgicaux lors de la réfection des pansements.

2.6 Tests phénotypiques

2.6.1 Étude de la résistance aux antibiotiques

L'ensemble des antibiogrammes ont été collectés à partir du système informatique du laboratoire (SIL) puis refaits sur place en Nouvelle-Calédonie, à partir des souches conservées à -80°C.

Après décongélation de la souche, repiquage sur gélose au sang et vérification de l'identification par Maldi-TOF (Bruker®), une suspension à 0,5 McFarland (McF) a été réalisée dans du sérum physiologique. Pour les antibiotiques le nécessitant, une dilution supplémentaire au dixième a été réalisée, pour retrouver les conditions analytiques en vigueur dans les recommandations éditées par le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) 2013. Les différentes géloses (MH-F, BioMérieux®) ont alors été ensemencées par écouvillonnage, les disques Biorad® et bandelettes E-test BioMérieux® ont ensuite été déposés, puis l'ensemble incubé 18-24 heures à 35°C ± 2°C, sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Le mode opératoire est présenté en annexe 3.

La lecture a été ensuite effectuée manuellement, par le même opérateur, à l'aide d'un pied à coulisse. La lecture par l'automate étant vérifiée au pied à coulisse en cas de doute (image pas assez visible à l'écran), il a été choisi pour plus de reproductibilité de réaliser toutes les lectures au pied à coulisse par une seule personne.

2.6.2 Test Elek

Les souches porteuses du gène de la toxine diphtérique ont été analysées au CNR pour savoir si cette dernière était exprimée, ceci par réalisation du teste d'immuno-précipitation Elek.

Ce test d'abord élaboré en 1948 (13,62) fut modifié en 1965 et 1997 (63,64) pour arriver à la version utilisée aujourd'hui :

Sur une gélose d'agar à pH=7,8 un disque imprégné d'antitoxine est déposé au centre et six dépôts bactériens sont effectués : deux témoins positifs (souche de référence national collection of type culture (NCTC) 10648), un témoin négatif, un témoin positif faible (souche de référence NCTC 3984) et deux fois la souche à tester. Un arc de précipitation s'observe lorsque l'antitoxine

rencontre la toxine, ce qui fait précipiter le complexe antigène-anticorps, visible en blanc dans la gélose.

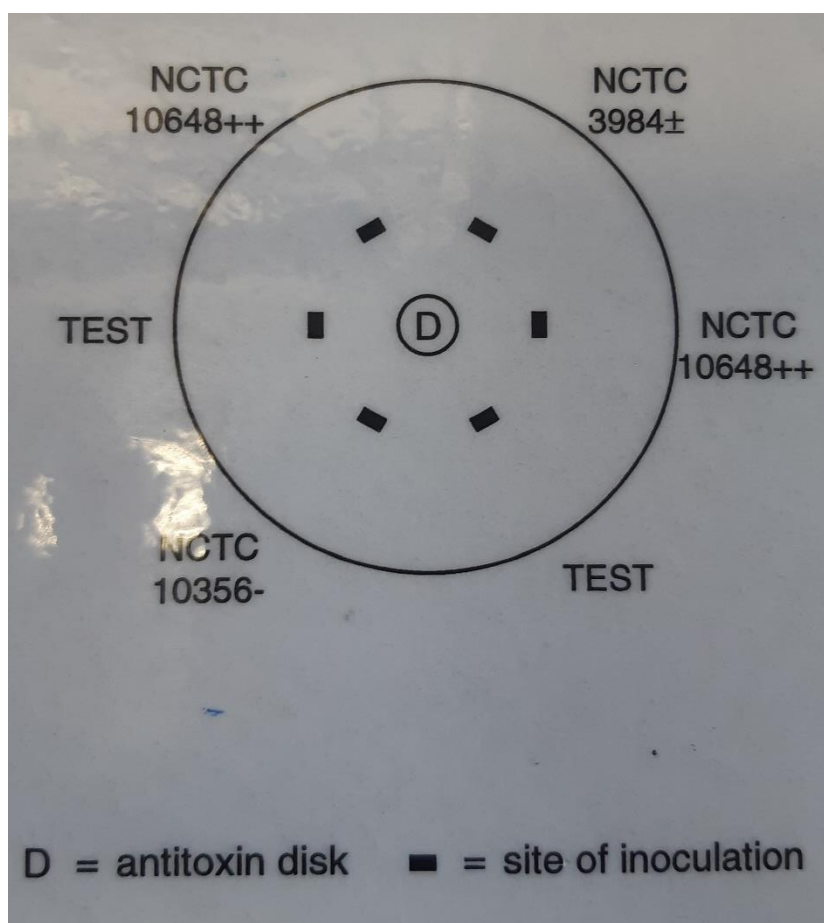


Figure 14 : Plan de dépose du test Elek (CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*).



Figure 15 : Vue à la loupe binoculaire des arcs de précipitation (CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*).

2.6.3 Détermination du biovar

La détermination du biovar d'une souche repose sur des caractères biochimiques. Elle est réalisée au CNR et repose sur deux techniques. Tout d'abord, la galerie d'identification API Coryne® caractérise chaque souche pour la nitrate réductase (cf. Introduction). Pour la fermentation du glycogène, le test du « Hiss serum water » a été réalisé comme suit :

Une solution A est obtenue par dissolution de 500 mg de peptone dans 100 mL d'eau distillée, puis 100 mg de Na_2HPO_4 sont ajoutés. Le mélange est porté à ébullition puis refroidi à température ambiante. Ensuite, 18 mL de sérum de cheval stérile sont ajoutés à ce mélange. En parallèle une solution B est préparée en ajoutant 430 mg d'acide fuchsine dans 86 mL d'eau distillée puis 14 mL de NaOH à 30 % sont ajoutés.

Puis 780 µL de solution B est ajouté au volume total de solution A. Le pH est ajusté à 7,7 en utilisant du HCl 5N et 100 mg de glycogène sont ensuite ajoutés. La solution est mélangée et répartie par aliquots de 3,5 mL dans des tubes à essai de 5 mL et stérilisée 30 minutes à 108 °C. Une öse de 10 µL de la souche à tester est rajoutée et après homogénéisation le milieu est incubé 24 heures à 37°C. Les souches NCTC 12077 et NCTC 764 ont été utilisées comme témoins positifs et négatifs respectivement (résultat attendu : rose foncé et rose clair respectivement).

Le biovar a été déterminé par la combinaison des tests de la nitrate réductase (positive pour *mitis* et *gravis*, négative pour *belfanti*) et de la fermentation du glycogène (positif uniquement chez *gravis*).

2.7 Biologie moléculaire

2.7.1 Détection du gène *tox*

En ce qui concerne les premières souches incluses dans l'étude avant décembre 2017, la détermination de la présence ou de l'absence du gène portant la toxine a été réalisée par le CNR, par PCR point final.

A partir de décembre 2017, avec l'aide du CNR, cette même technique a été mise au point au CHT par PCR temps réel.

La réalisation de la PCR est effectuée dans le service spécialisé de biologie moléculaire (locaux adaptés avec « marche en avant », personnel dédié et spécialisé). L'étape d'extraction débute en bactériologie où une suspension bactérienne est mise en contact d'un tampon de lyse contenant du lysozyme, afin de lyser la paroi de la bactérie Gram positive. L'extraction est ensuite effectuée à partir de 200 µL de suspension de manière automatisée.

Une fois l'extrait obtenu, il est mélangé à un mix réactionnel préparé extemporanément. Ce mix comprend tous les éléments nécessaires à la PCR, à savoir les nucléotides, la Taq polymérase (enzyme utilisée pour l'amplification de l'ADN), la sonde et les amorces suivantes :

Amorce Cdiph-RTDT_Fw : 5'-TTA-TCA-AAA-GGT-TCG-GTG-ATG-GTG- 3'

Amorce Cdiph-RTDT_rev2 : 5'-AAT-CTC-AAG-TTC-TAC-GCT-TAA-C- 3'

Sonde Cdiph-RTDT_So : 6-FAM-5'CGC-GTG-TAG-TGC-TCA-GCC-TTC-CCT-3'-TAMRA

Les amorces utilisées sont celles de la publication de Schuhegger R. et al (65).

Pour chaque série un contrôle négatif et un contrôle positif sont également réalisés. L'amplification est réalisée sur 45 cycles. Enfin, les courbes sont lues par un technicien de biologie moléculaire puis vérifiées par le biologiste ou l'interne chargé de la validation.

2.7.2 Next generation sequencing (NGS)

L'ensemble des souches disponibles dans nos collections ont été envoyées au CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae* et toutes les souches disponibles correspondant à cette étude ont été analysées par séquençage haut débit ou Next-Generation Sequencing (NGS).

Cette technique permet de séquencer des milliers de gènes de plusieurs souches simultanément, beaucoup plus rapidement qu'avec les techniques de séquençage Sanger. Cela a révolutionné l'étude de la génomique et de la biologie moléculaire. Différentes technologies ont été développées parmi lesquelles Illumina®, utilisée dans cette étude.

L'extraction de l'ADN bactérien se fait après mise en contact de la souche à extraire avec un tampon de lyse contenant du lysozyme pendant 1h à 37°C. L'extraction est réalisée en utilisant le kit QIAGEN® DNeasy® blood & tissue.

Une première étape est la préparation de banques ou librairies. Elles sont créées en fragmentant de manière aléatoire l'ADN ou l'ARN puis en liant chaque fragment obtenu avec des petites séquences spécifiques synthétisées pour servir de code barre moléculaire, ou adaptateur.

Ensuite chaque séquence est amplifiée en pont (bridge amplification).

Enfin le séquençage à proprement parler est effectué par synthèse. À chaque incorporation d'une base, un signal de fluorescence est émis.

Les données sont ensuite traitées par des logiciels de bio-informatique pour constituer les séquences brutes d'ADN qui seront par la suite exploitées.

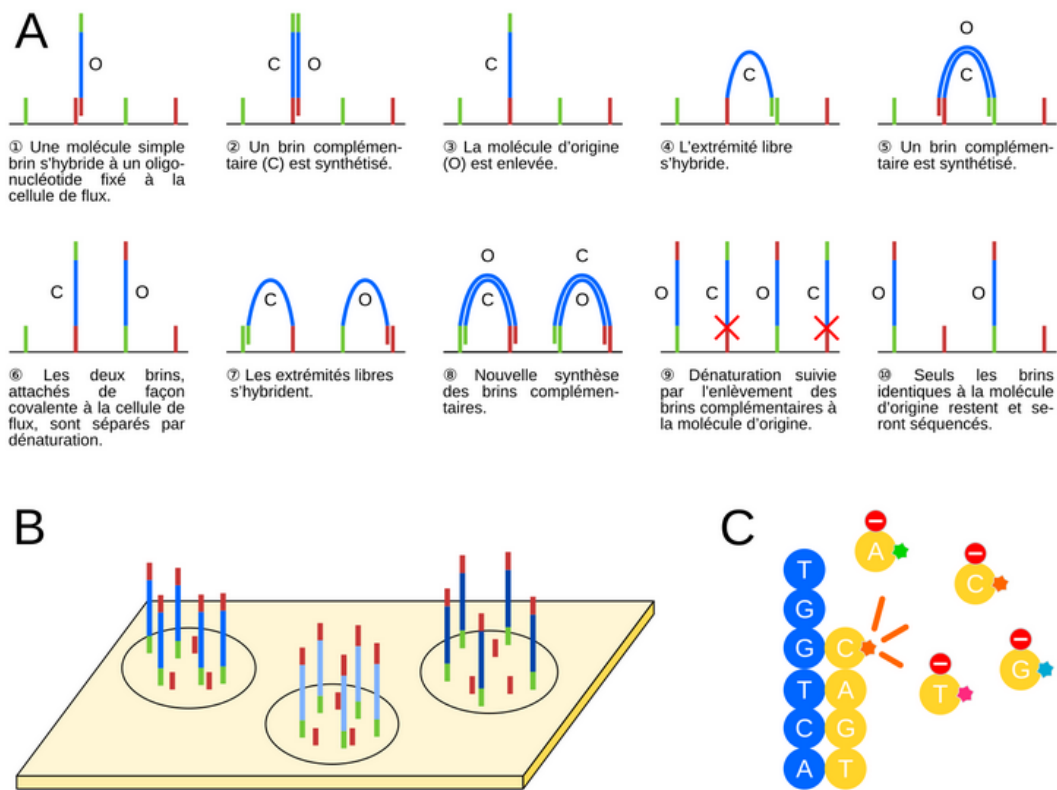


Figure 2 - Le principe de la technologie Illumina

(A) Représentation schématique du processus d'amplification en pont (*bridge amplification*) des clusters sur la cellule de flux (*flow cell*, trait noir). Les adaptateurs et les oligonucléotides complémentaires présents sur la cellule de flux sont indiqués en rouge et vert, les fragments d'ADN à séquencer en bleu. La molécule s'étant initialement fixée à la cellule de flux, et les brins dont la séquence est identique, sont notés O ; les brins complémentaires sont notés C. À l'étape 9, les brins complémentaires à la molécule d'origine sont éliminés par clivage chimique d'un nucléotide modifié dans l'oligonucléotide « rouge » fixé à la cellule de flux (croix rouges). (B) Différentes molécules d'ADN sont amplifiées puis séquencées en même temps sur une même cellule de flux. (C) Réaction de séquençage. Une polymérase synthétise un brin complémentaire (jaune) au brin situé sur la cellule de flux (bleu) en incorporant des nucléotides qui portent des groupes fluorescents (bleu, rose, orange, ou vert) et un groupe « stop » qui bloque la polymérisation. S'ensuit une étape d'imagerie afin d'identifier le nucléotide incorporé. Ensuite, les groupes fluorescents et « stop » sont enlevés et le processus se répète.

Auteur : Pascal Combemorel et Erwin van Dijk

Licence : [CC-BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Figure 16 : Principe du NGS.

2.7.3 Étude de la diversité des souches

Le séquençage des souches est réalisé par l'automate NextSeq 500 d'Illumina®, avec un « 2*150 nt paired-end » protocole, permettant de lire chaque séquence deux fois : une fois dans le sens 5' 3' et l'autre fois dans le sens contraire.

Le *core* génome a été défini par l'ensemble des gènes partagés par plus de 95 % des souches étudiées et des souches de référence. Ce *core* génome représente 1 827 gènes pour cette étude (pour des études de plus grande importance, avec une plus grande diversité de souches, ce nombre est moins élevé.)

L'alignement de séquences multiples du génome central (cg-MSA) a été obtenu à partir des séquences du génome assemblé. Pour cela, les séquences du génome ont été annotées à l'aide de

PROKKA® v1.14.2 avec des paramètres par défaut, ce qui a donné des fichiers « general feature format » (GFF). Roary® v3.6 a été utilisé pour définir les groupes de gènes codant pour les protéines, avec un seuil fixé à 70 % d'identité d'acides aminés. Les gènes centraux ont été définis comme étant présents dans 95 % des génomes et ont été concaténés en un cg-MSA par Roary®.

Les souches de référence qui ont été choisies pour cette étude sont les suivantes :

- La souche « NCTC 10648 » qui est utilisée en particulier comme témoin positif dans le test Elek.
- La souche type 11397, utilisée pour toutes les méthodes expérimentales de détermination de phénotype. C'est la souche type de l'espèce *C. diphtheriae*.
- La souche 13129 est la souche de référence dans les études génomiques.

La souche PW8 n'a pas été incluse, en effet, elle sert de référence au niveau génétique pour les souches *tox+*, or nous n'avons que très peu de souches *tox+*, il n'y a donc pas d'intérêt à l'inclure dans ce travail.

2.7.4 Détermination des gènes de résistance

Les gènes de résistance connus ont été recherchés parmi les souches étudiées. Il a été utilisé un « basic local alignment search tool » (un BLAST) pour essayer de trouver une correspondance entre l'ensemble des gènes de résistance connus sur la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) et la séquence des souches étudiées. Des seuils d'identité (pourcentage des séquences identiques entre les deux gènes) à 80 % et de couverture (pourcentage des régions couvertes par l'analyse) à 80 % ont été fixés.

3. Troisième partie : résultats

3.1 Données épidémiologiques

3.1.1 Répartition géographique des cas

La répartition géographique des cas est illustrée sur la figure suivante : on observe deux zones particulièrement représentées : Nouméa avec 22 cas (26,8 %) et Lifou avec 18 cas (22 %) sur les 82 souches où la donnée était disponible. Pour deux souches, le lieu de résidence n'a pas pu être relevé.

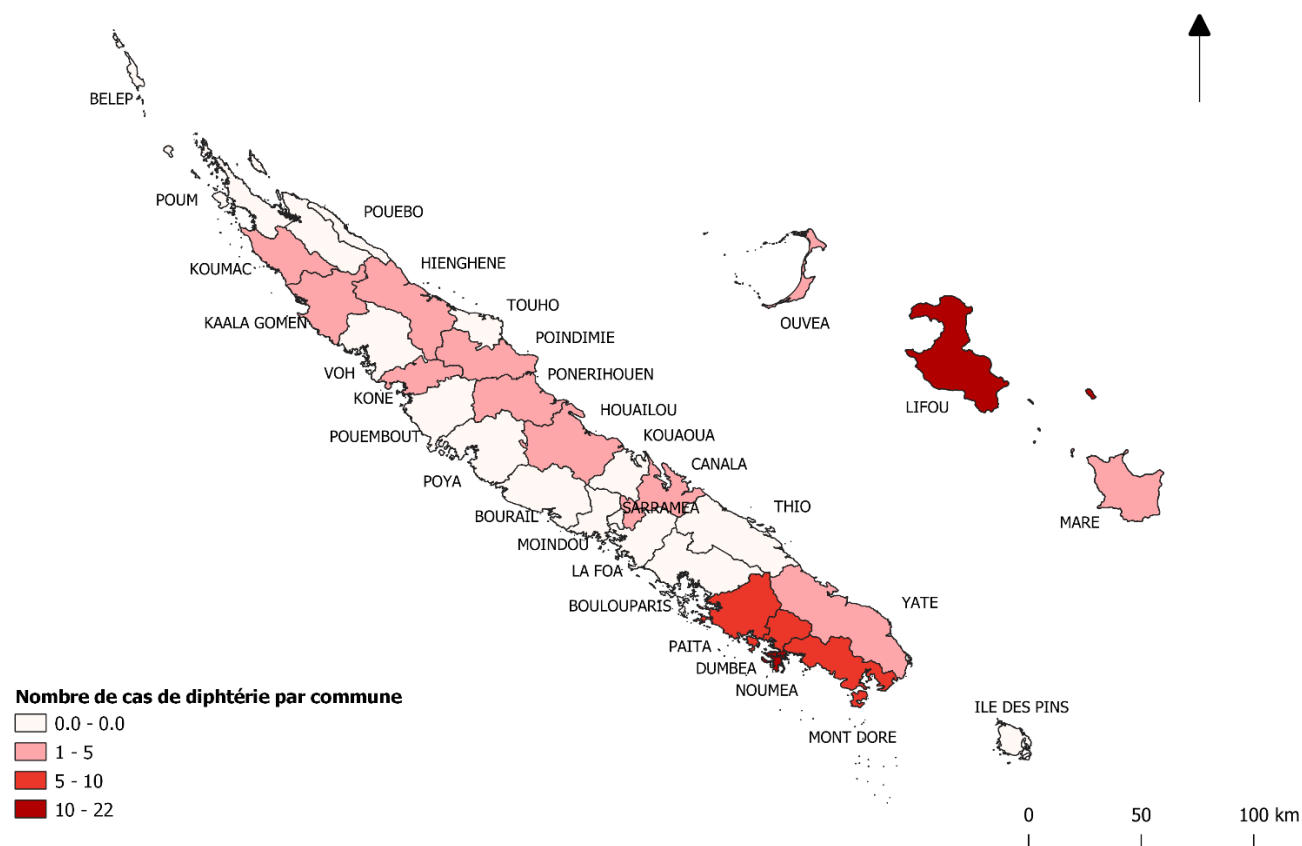


Figure 17 : Répartition du nombre de cas par commune. Carte réalisée par Simon Joxe.

3.1.2 Évolution du nombre annuel de cas

L'évolution du nombre de cas de diphtérie par an est représentée dans la figure suivante : on observe une augmentation du nombre de cas à partir de 2014.

Nombre de cas de diphtérie

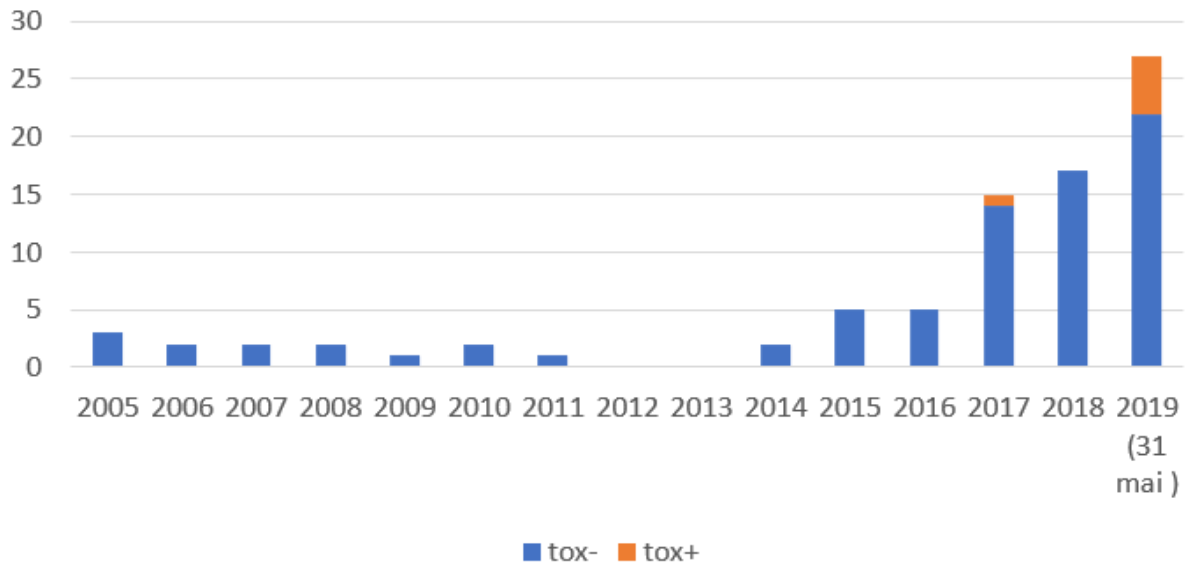


Figure 18 : Nombre de cas de diphtérie par an.

3.1.3 Données cliniques

En ce qui concerne le relevé clinique réalisé, malgré une recherche poussée dans les données du laboratoire, les dossiers cliniques et le déplacement au niveau du dispensaire de Lifou, les données récoltées ne sont que très parcellaires et seule une infime partie des données recherchées ont été retrouvées chez au moins la moitié des cas inclus. Beaucoup de paramètres n'ont été trouvés que chez quelques patients, ce qui rend les données non exploitables et non représentatives de l'échantillon. Les paramètres suivants ont néanmoins pu être relevés en quantité suffisante pour pouvoir être représentatifs de l'échantillon :

La présence ou non d'autres bactéries en plus de *C. diphtheriae* a pu être relevée pour 82 souches sur les 84 étudiées. Les pourcentages qui suivent sont donc réalisés sur ce total de 82 souches.

- 42 isollements se sont faits de façon concomitante à *S. aureus*, soit 51,2 % des souches.
- 41 isollements se sont faits de façon concomitante à *Streptococcus pyogenes*, soit 50 % des souches.
- 25 souches ont été isolées à la fois avec *S. aureus* et *S. pyogenes*, soit 30,5 % des 82 souches.
- 67 souches ont été isolées avec au moins une autre bactérie, soit 81,7 % des souches.
- 15 souches ont été isolées en culture pure, soit 18,3 % des souches.

L'atteinte était cutanée pour 69 cas sur les 82 où l'information était disponible, soit 84,1 %. Pour ces prélèvements, 42 (60,9 %) contenaient du *S. aureus*, 41 (59,4 %) du *S. pyogenes*, 58 (84,1 %) au moins un des deux derniers germes, 65 (94,2 %) ont été isolés avec au moins une autre bactérie.

Neuf cas ont été isolés d'hémocultures, tous retrouvés en culture pure.

- Pour un cas, il n'a été retrouvé qu'une hémoculture positive en plus de 75 heures et sans signe cardiaque associé.

- Pour un cas, l'origine de l'infection était probablement une ostéite, il n'a pas été retrouvé de végétation à l'ETT ni à l'ETO, un curetage de l'ostéite a été réalisé.
- Pour un cas, les données sont manquantes.
- Pour six cas, il a été découvert une endocardite, pour deux cas sur sonde de pace maker et valve tricuspide, les autres sur valve mitrale.

Une notion de l'état vaccinal a été retrouvé pour 39 dossiers sur les 84 étudiés (46,4 %). Sur 33 dossiers soit 84,6 % des cas où la donnée a pu être récupérée, les vaccinations étaient marquées comme à jour, le patient comme vacciné, le test TQS était positif, ou pour 1 cas le dossier concernait un nourrisson non encore vacciné car trop jeune. 6 personnes n'étaient pas à jour de leur vaccination ou présentaient un TQS négatif.

Sur les 84 cas, une hospitalisation a été nécessaire pour 50 cas. L'information n'était pas disponible pour 16 cas, il n'y a pas eu d'hospitalisation pour 18 cas. Ce qui fait une hospitalisation dans 73,5 % des cas où la donnée a pu être retrouvée.

Pour le traitement antibiotique, l'information n'a pas été retrouvée pour 13 cas. 4 patients n'ont pas reçu d'antibiothérapie et 67 (94,4 %) cas en ont reçu une. Parmi ces 67 épisodes, 29 (43,8 %) ont été traités par l'association amoxicilline + acide clavulanique (Augmentin®) dont 4 associés à la gentamicine. Le deuxième antibiotique le plus utilisé est l'amoxicilline utilisée 8 fois (11,9 %) dont une fois associé à la gentamicine, puis la pristinaamycine (Pyostacine®) utilisée 7 fois (10,4 %). La clindamycine 5 fois (7,5 %), associée à la pénicilline G deux fois, à la Tazocilline et gentamicine une fois. Les fluoroquinolones 4 fois, une fois associées au Bactrim® une fois associées à la gentamicine.

La voie d'administration n'a pas été retrouvée pour 10 cas, pour les 57 cas restants, pour 21 cas (36,8 %) l'antibiothérapie était administrée au moins pour une partie du traitement par voie intraveineuse. Dans 36 cas (63,2 %), seule la voie orale a été utilisée.

Le résultat du dosage de la protéine C réactive (CRP) a été retrouvé pour 32 cas. Parmi ces 32 cas, la CRP n'était inférieure à 10 mg/L que pour 3 cas.

3.1.4 Investigations autour des cas

Tous les cas de diphtérie déclarés sont investigués. Dans les cas où le gène de la toxine diphtérique n'a pas été retrouvé, les enquêtes ne sont pas poursuivies. Les cas contacts ayant des vaccinations non à jour effectuent les rappels nécessaires et il n'y a pas de traitement antibiotique prophylactique des cas contacts.

Lors de l'une de ces enquêtes, l'un des cas contact prélevé s'est révélé à son tour porteur de *C. diphtheriae* au niveau ORL. Ces deux souches liées épidémiologiquement sont les souches FRC0492 et FRC0493.

Les deux épisodes où une souche de diphtérie *tox+* a été isolée ont fait l'objet d'enquêtes plus approfondies. Dans un premier cas en 2017, il n'a pas été retrouvé de diphtérie dans l'entourage, dans le second cas en 2019, il a été retrouvé de la diphtérie *tox+* chez 5 patients en tout (cas index compris).

En ce qui concerne le cas de 2017 :

La patiente de 71 ans était suivie depuis longtemps en Nouvelle-Calédonie, mais allait régulièrement au Vanuatu dans sa famille. Elle ne comprenait pas le français, ce qui a compliqué un peu les recherches autour de ce cas. La patiente était en bonne santé lorsqu'elle s'est rendue au Vanuatu le 5 janvier 2017. Elle a séjourné à Port Vila (Capitale du Vanuatu) dans sa famille du 5 janvier au 27 janvier 2017. Durant son séjour, la patiente a manifesté de la fatigue, de la fièvre, en même temps qu'une plaie à la jambe qu'elle pense s'être faite avec une plante ou avoir subi une piqûre d'insecte. Elle n'a pas consulté, n'a pas apporté de soin particulier à la plaie et ne la désinfectait pas. Elle expliquait juste avoir appliqué du manioc râpé sur la plaie un jour de préparation du Laplap (plat traditionnel du Vanuatu). De retour en Nouvelle-Calédonie, elle a séjourné chez sa fille du 27 janvier 2017 au 4 février 2017. Le 4 février elle est retournée dans sa maison avec ses petits enfants qui se sont inquiétés de son état de santé et l'ont emmenée aux urgences le 4 février 2017. Un prélèvement a été réalisé le 5 février retrouvant du streptocoque du groupe A et *C. diphtheriae*. Le statut toxinique de la souche n'a pas été connu jusqu'au 15 février 2017. Il n'a pas été possible de savoir si sa vaccination était à jour. Un TQS réalisé aux urgences le 5 février 2017 dans le cadre d'une recherche d'immunité antitétanique était positif. Les vaccinations antitétaniques et antidiphthériques étant combinées, on peut penser qu'elle était correctement vaccinée contre la diphtérie. La patiente a été traitée par amoxicilline 500 mg matin, midi et soir pendant 14 jours.

L'enquête autour du cas a permis d'identifier 13 cas contacts, tous asymptomatiques que ce soit au niveau cutané ou respiratoire. Tous ont été prélevés au niveau de la gorge et aucun prélèvement n'est revenu positif. Parmi ces 13 cas contacts, les vaccinations ont été vérifiées et 7 personnes ont été vaccinées car non à jour.

En ce qui concerne les cas de 2019 :

L'histoire commence avec deux frères de 2 et 5 ans ayant voyagé au Vanuatu du 7 au 21 janvier 2019, accompagnés de leur famille.

Le patient de 2 ans a été hospitalisé au CHT le 9 février 2019 pour une pyodermite de la main. À l'interrogatoire, le contact avec des cousins au Vanuatu ayant la gale a permis d'isoler l'enfant en chambre seule dès son arrivée. Les vaccinations DTP ont été effectuées à 2 mois, 4 mois et 13 mois (les recommandations sont en faveur d'une vaccination contre la diphtérie à 2 mois, 4 mois et 11 mois). Il présentait une hyperleucocytose à 26 940 leucocytes par mm³ dont 11 000 Polynucléaires neutrophiles par mm³. Il a été traité par l'association amoxicilline - acide clavulanique par voie IV associé à de la gentamicine pendant deux jours, puis un relais a été effectué pour de l'amoxicilline - acide clavulanique seul par voie orale, pour une durée totale d'antibiothérapie de 6 jours.

Le patient de 5 ans a été vu aux urgences pédiatriques le 9 février 2019 pour une pyodermite de la main également. Un prélèvement a été réalisé, il n'a pas été hospitalisé et est reparti à domicile après les soins. Ce patient était à jour de ses vaccinations, notamment antidiphthériques. Il a été traité par l'association amoxicilline-acide clavulanique pendant 6 jours par voie orale.

La date de début des symptômes a été déterminée au 21 Janvier 2019, date d'arrivée en Nouvelle-Calédonie depuis le Vanuatu. L'enquête menée par la DASS a donc retracé les contacts des deux cas index 7 jours avant l'apparition des symptômes, soit le 14 janvier 2017. Cette enquête a permis d'identifier 40 contacts étroits, parmi lesquels trois nouveaux cas ont été identifiés : le grand frère des deux cas index, leur oncle et leur grand-mère.

Le patient de 2 ans, déjà en chambre seule pour suspicion de gale, a été mis en précautions complémentaires contact (PCC) et gouttelettes. Les PCC- gouttelettes et gale sont décrites dans le chapitre discussion.

Au niveau du CHT, 22 personnes ont été identifiées comme ayant été en contact avec les deux patients : des agents d'entretien, aides-soignantes, infirmières, cadre ou médecin, des services des urgences et de pédiatrie. L'ensemble des personnes concernées ont été prélevées entre le 12 et le 15 février, au plus tôt en fonction des disponibilités de chacun, avec port d'un masque chirurgical en attendant les résultats du prélèvement. Le 15 février, devant le résultat positif de la toxine diphtérique et le nombre de cas contacts secondaires positifs, une antibioprophylaxie par amoxicilline 3g/j en trois prises pendant sept jours a été prescrite à l'ensemble des cas contacts.

Au niveau familial :

Les deux cas index avaient une grande sœur de 10 ans à jour de ses vaccinations et un grand frère de 13 ans qui a été revacciné le 13 février. Tous les deux avaient des symptômes cutanés, ils ont tous les deux été prélevés le 13 février au niveau cutané et au niveau de la gorge.

Le père et la mère des enfants ne connaissaient pas leur statut vaccinal, ils ont tous deux reçus un rappel de vaccination les 13 et 14 février respectivement. Ils ont été traités par azithromycine pendant 3 jours. Le père avait des symptômes cutanés et a donc été prélevé le 13 février au niveau cutané et ORL. La mère, asymptomatique, a été prélevée uniquement au niveau de la gorge le 14 février.

L'oncle du côté paternel ne se souvenait pas de son dernier vaccin, il a été revacciné le 13 février. Il présentait des symptômes au niveau cutané, il a donc été prélevé le même jour au niveau cutané et ORL. Il a reçu une antibioprophylaxie par azithromycine pendant trois jours.

La grand-mère a été vue le 13 février, asymptomatique, a reçu une antibioprophylaxie par azithromycine pendant trois jours et a été prélevée au niveau de la gorge.

Au total, entre le 13 et le 15 février, suite à l'enquête familiale autour de ces deux cas index, 18 personnes ont été identifiées comme contacts étroits. Ces cas contacts ont été prélevés au niveau ORL (et cutané si symptômes) et ont tous reçu une antibioprophylaxie par azithromycine pendant 3 jours pour les adultes, par josamycine pendant 7 jours pour les enfants. 14 personnes ont été revaccinées. Toutes ont eu un arrêt de travail ou de scolarité jusqu'à réception des résultats négatifs. Parmi les 18 personnes prélevées, trois se sont avérées porteuses de *C. diphtheriae* : le grand frère de 13 ans au niveau cutané et ORL, l'oncle au niveau cutané uniquement et la grand-mère au niveau ORL uniquement.

Devant d'une part le caractère toxique et d'autre part une grande contagiosité (3 contacts étroits positifs sur les 18 identifiés et testés), la DASS a pris la décision d'hospitaliser les cas positifs pour isolement et contrôle de l'observance du traitement. Les cas contacts au CHT ont également reçu une antibioprophylaxie par amoxicilline.

Les quatre enfants ont été hospitalisés : les deux cas index, le cas contact positif et également la sœur dont le prélèvement était négatif mais qui était contact très proche. Ils ont été hospitalisés en pédiatrie, leur mère les accompagnant. Les chambres étaient au bout du couloir, les visites très limitées et les précautions complémentaires contact, gouttelettes et gale mises en place. Les enfants testés positifs sont sortis après 14 jours d'antibiothérapie (7 jours pour la sœur négative) par josamycine et des prélèvements de gorge négatifs à J15 et J16 du début de l'antibiothérapie. Des prélèvements ont également été réalisés à J30 de l'antibiothérapie. L'ensemble de la famille a reçu un traitement contre la gale.

La grand-mère et l'oncle ont été hospitalisés en chirurgie orthopédique (unité de cohorting avec personnel formé) pour assurer l'isolement et l'observance d'un traitement par azithromycine pendant trois jours. Des prélèvements de gorge ont été réalisés à J5 et J6 du début de l'antibiothérapie

et les patients sont sortis après les deux résultats négatifs. Un contrôle à J30 a été réalisé en externe. Ils ont tous deux été revaccinés.

Le bionettoyage de toutes les chambres s'est effectué en trois temps : détergent, rinçage, détergent-désinfectant.

Suite à la découverte de trois nouveaux cas positifs, une seconde enquête a été menée autour des nouveaux cas. Pour le frère, les cas contacts étant les mêmes, il n'y a pas eu de nouvelles investigations.

La grand-mère a quitté pour sa part la Nouvelle-Calédonie pour Tahiti du 8 au 27 janvier, avec un groupe de 24 personnes de Nouvelle-Calédonie dans le cadre d'un voyage religieux. Ils priaient toute la journée, sauf un jour où ils ont fait une balade en bus. Ils séjournaient dans un motel accolé au « temple », à 3 personnes par chambre. Une des personnes partageant sa chambre était une femme enceinte de 7 mois asymptomatique, dont le prélèvement de gorge réalisé le 16 février est revenu négatif.

Les enquêtes autour de l'ensemble des cas positifs, ont conduit à l'identification de 38 cas contacts en Nouvelle-Calédonie, en plus des 22 travaillant au CHT. Tous ont au minimum été prélevés, revaccinés lorsqu'il y en avait besoin et reçu une antibioprophylaxie par azithromycine 500 mg pendant trois jours pour les adultes ou josamycine pendant sept jours pour les enfants.

Les cellules d'enquête de Polynésie française et du Vanuatu ont été contactées pour réaliser des enquêtes autour de ces cas.

Au Vanuatu, 2 adultes et 4 enfants dont les 2 cas index et un cas contact positif, ont séjourné dans une même maison, dans le village de Mele près de Port Vila. Les investigations sur place ont permis de prélever 6 cas contacts, chez qui il a été prélevé 6 écouvillons de gorge et 3 cutanés. Deux se sont avérés positifs : un cas avec présence du gène *tox* sur un écouvillon cutané, l'autre cas avec absence du gène *tox*, sur un écouvillon de gorge. La bactérie *tox-* a pu être isolée en bactériologie, l'antibiogramme réalisé et la souche envoyée au CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*. Pour le cas avec présence de toxine, la souche n'a malheureusement pas pu être isolée en culture probablement à cause d'un délai d'acheminement au laboratoire dépassé. Le résultat est basé uniquement sur l'extraction du matériel génétique présent sur l'écouvillon et la réalisation de la PCR temps réel sur cet extrait.

3.2 Données d'antibiorésistance

Sur les 84 souches, 58 ont été retenues pour la publication d'un article : ont été conservées les souches de 2015 à 2019 où les données de l'antibiogramme ont pu être réalisées de manière uniforme sur place et les génomes séquencés. La souche provenant d'un cas contact au Vanuatu a également été incluse.

Pour les souches retestées (61 souches, dont les 58 postérieures à 2015 qui ont été incluses dans l'article), la répartition des CMI et diamètres observés est représentée dans les graphiques ci-après :

Sont symbolisés en vert jaune et rouge les interprétations selon le CASFM (version 2019, ou 2013 selon l'antibiotique testé) quant à la catégorisation en "sensible", "intermédiaire" et "résistant".

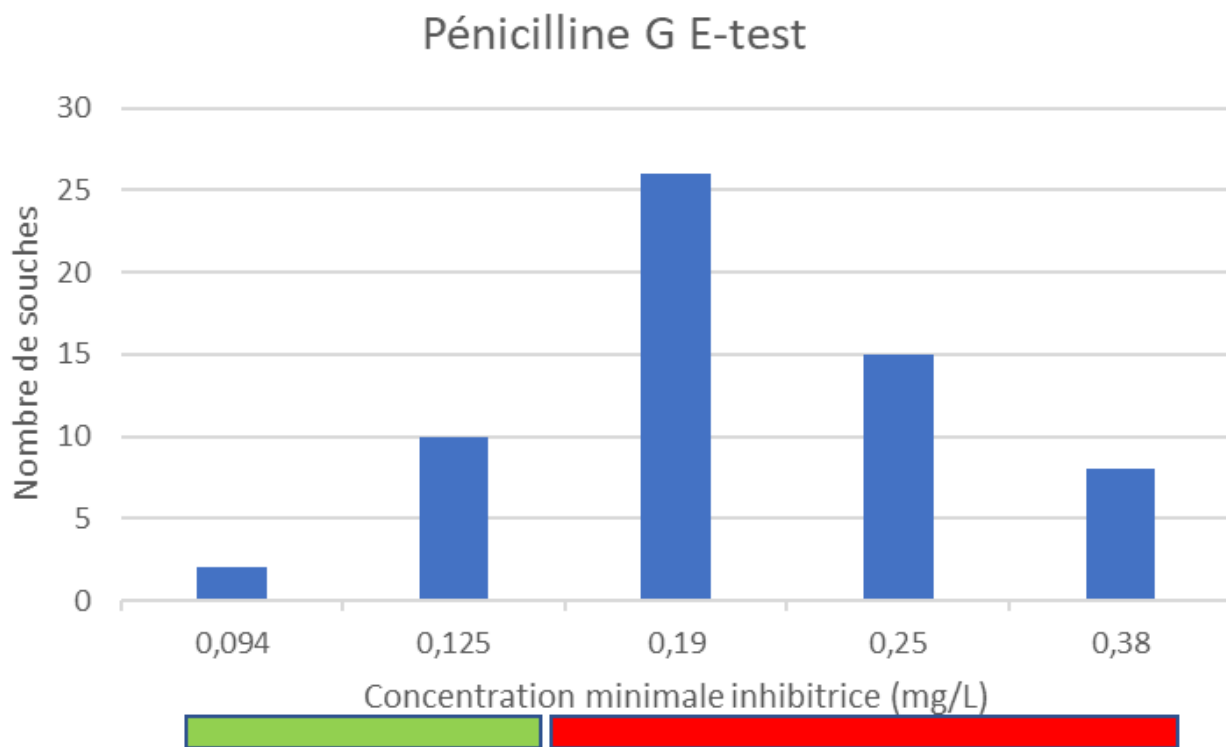


Figure 19 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices pour la pénicilline G (sensible si $\leq 0,125$ mg/L).

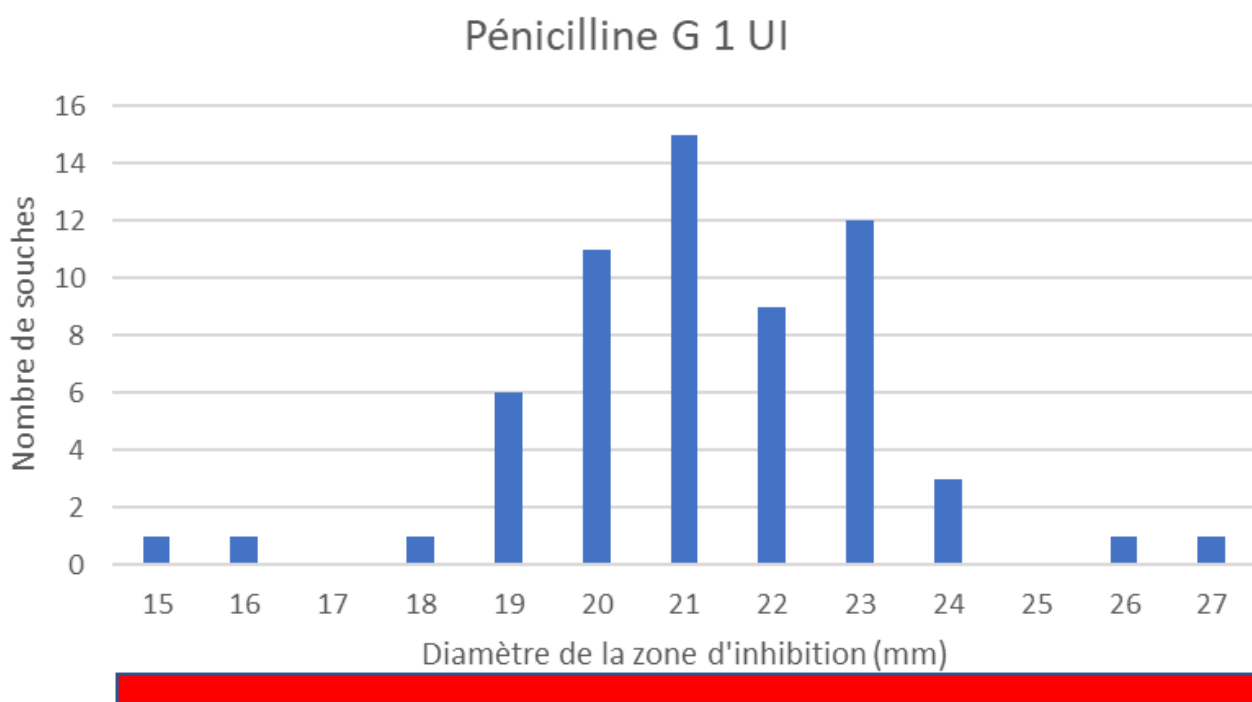


Figure 20 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la pénicilline G 1UI (sensible si ≥ 29 mm).

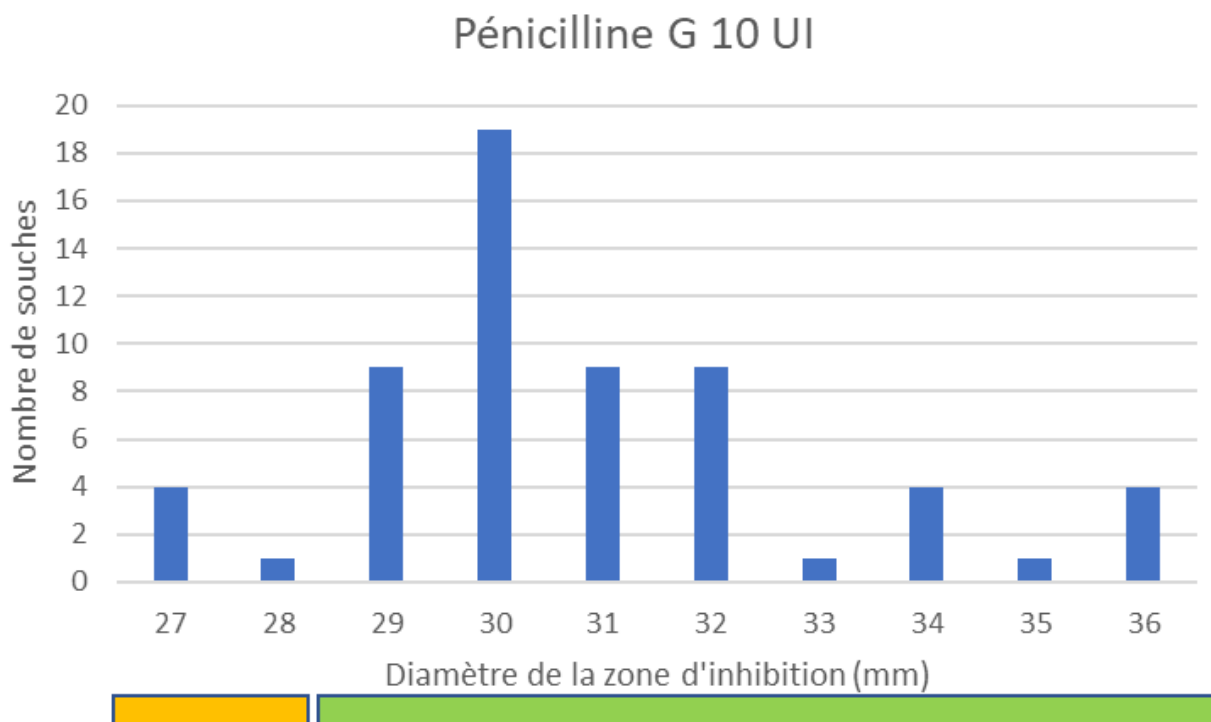


Figure 21 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la pénicilline G 10 UI, solution 0,5 McF diluée au 10ème (CASFM 2013) (sensible si ≥ 29 mm, résistant si < 18 mm).

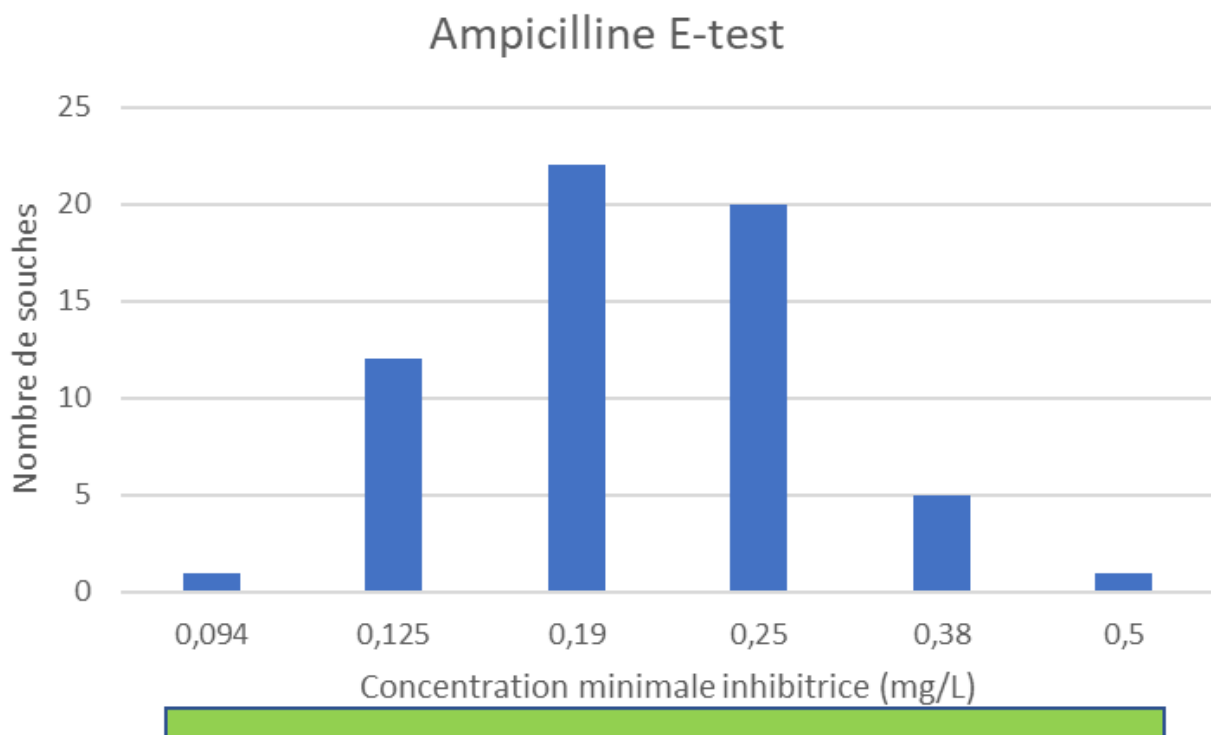


Figure 22 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices pour l'ampicilline (sensible si ≤ 2 mg/L).

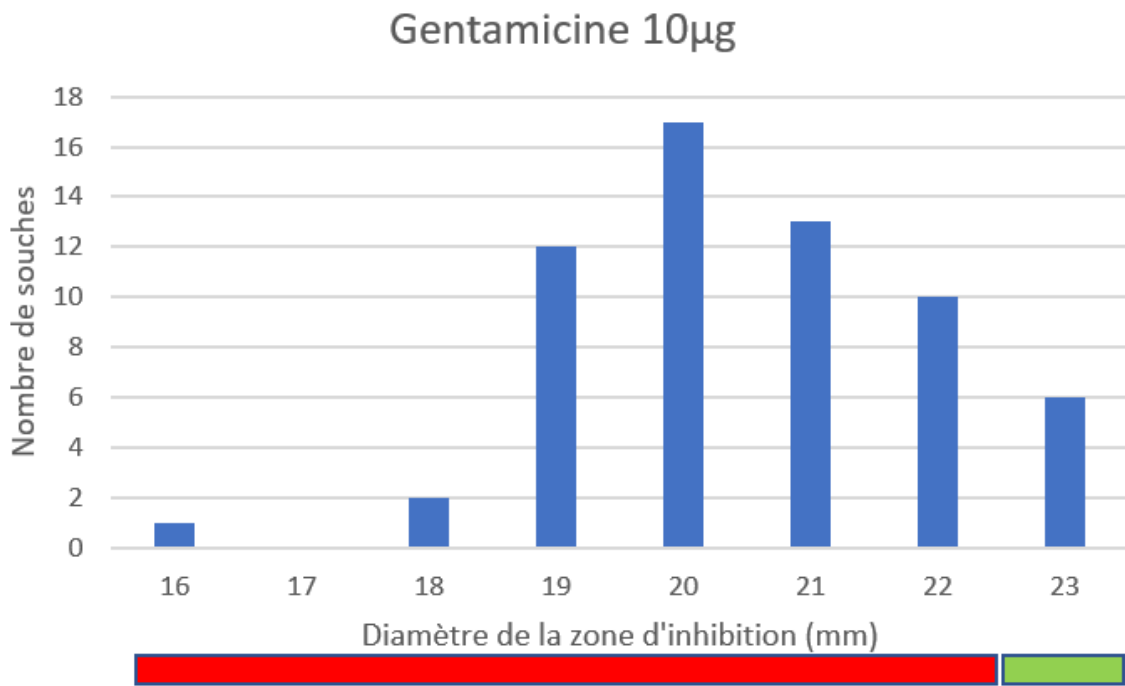


Figure 23 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la gentamicine (sensible si ≥ 23 mm).

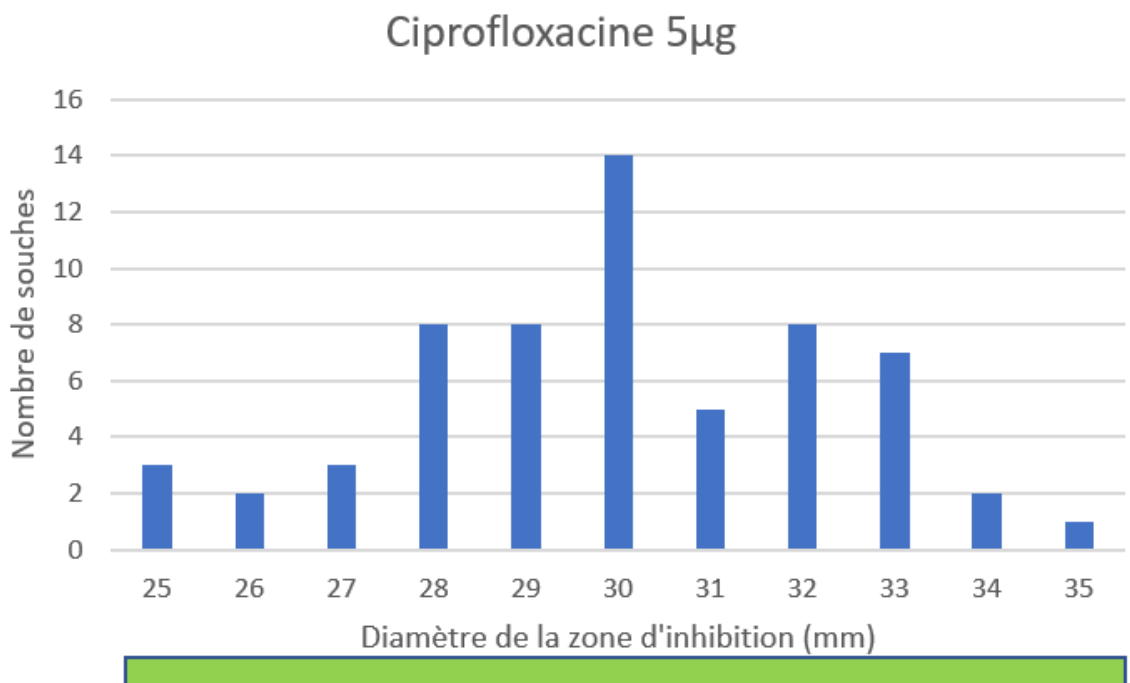


Figure 24 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la ciprofloxacine (sensible si ≥ 25 mm).

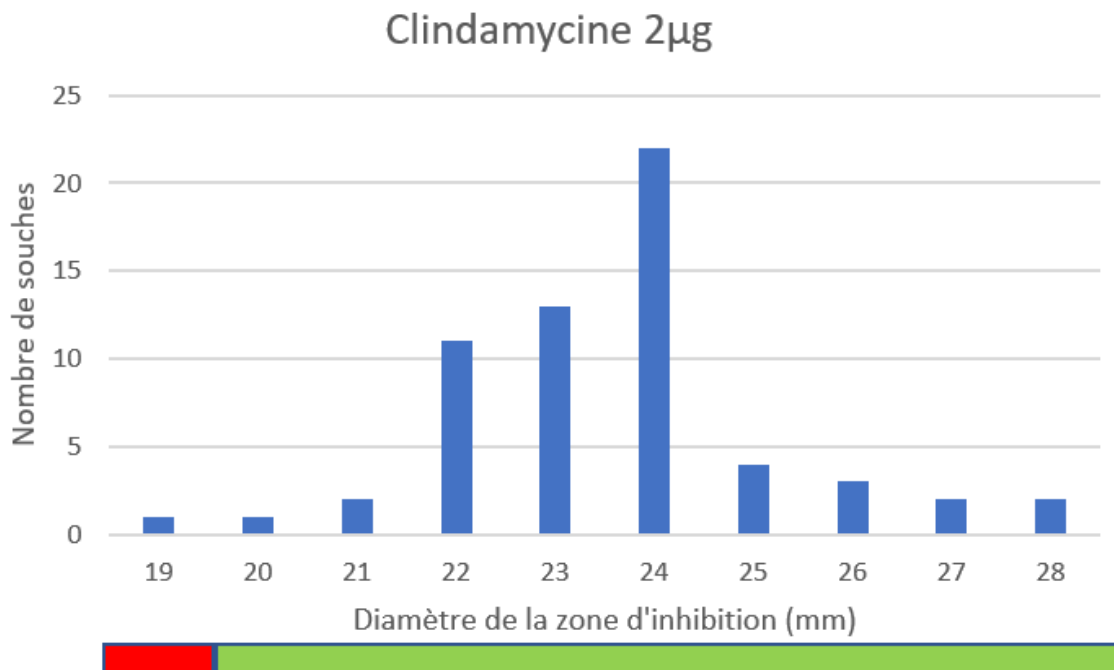


Figure 25 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la clindamycine (sensible si ≥ 20 mm).

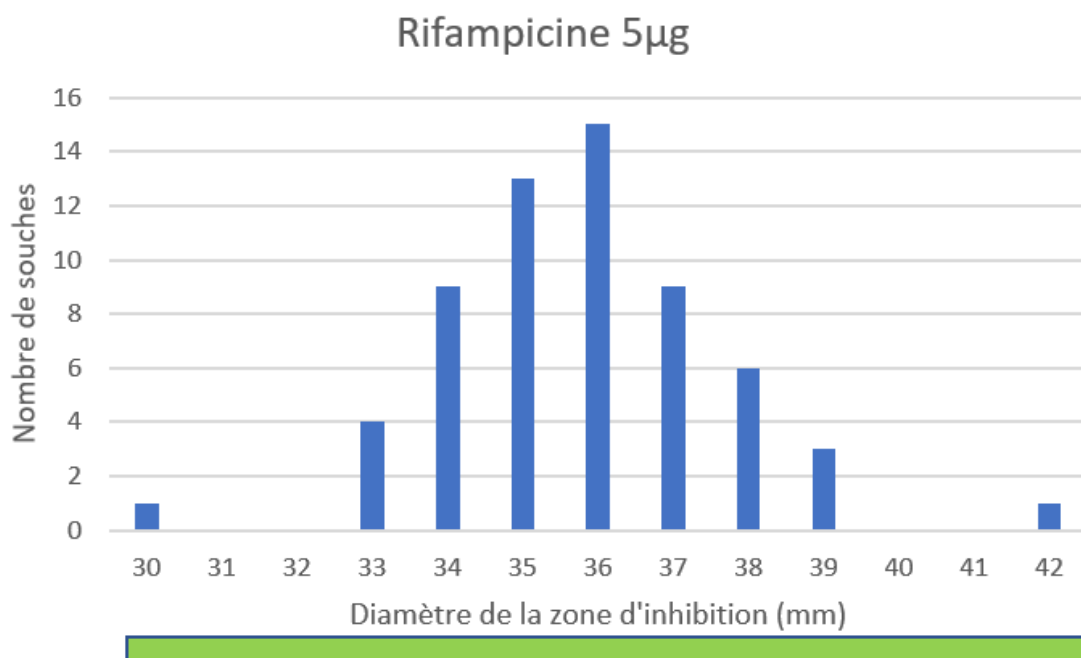


Figure 26 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la rifampicine (sensible si ≥ 30 mm).

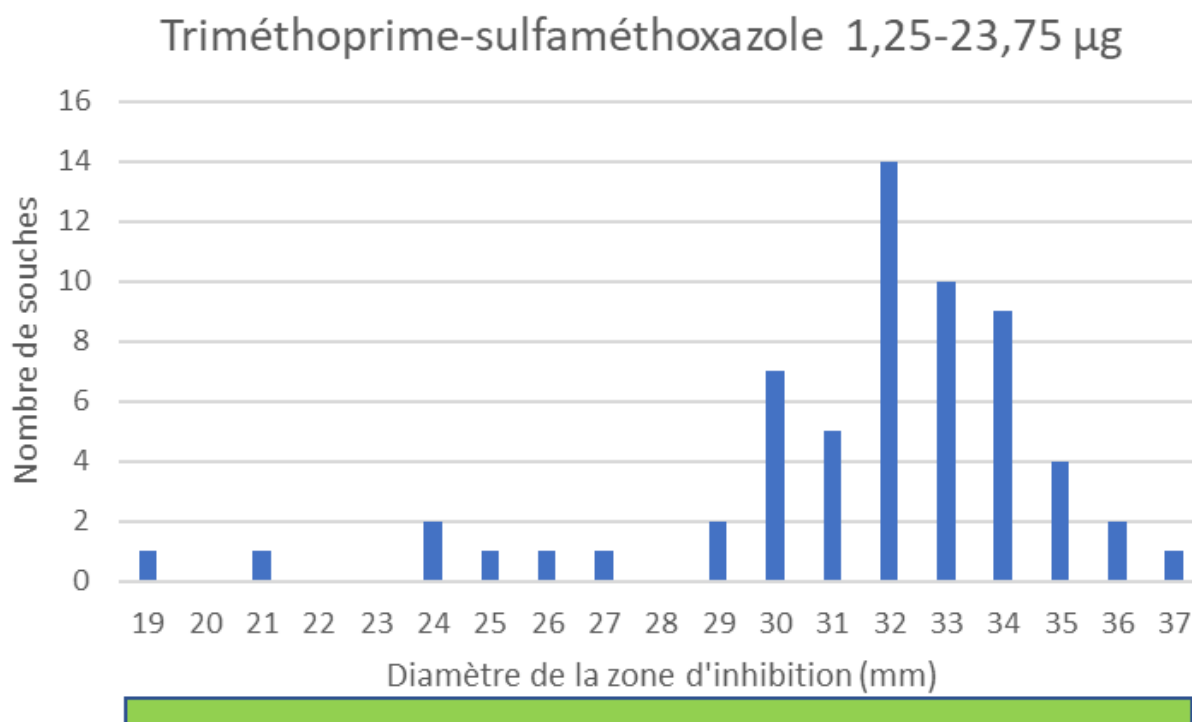


Figure 27: Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour le triméthoprim-sulfaméthoxazole (sensible si ≥ 19 mm).

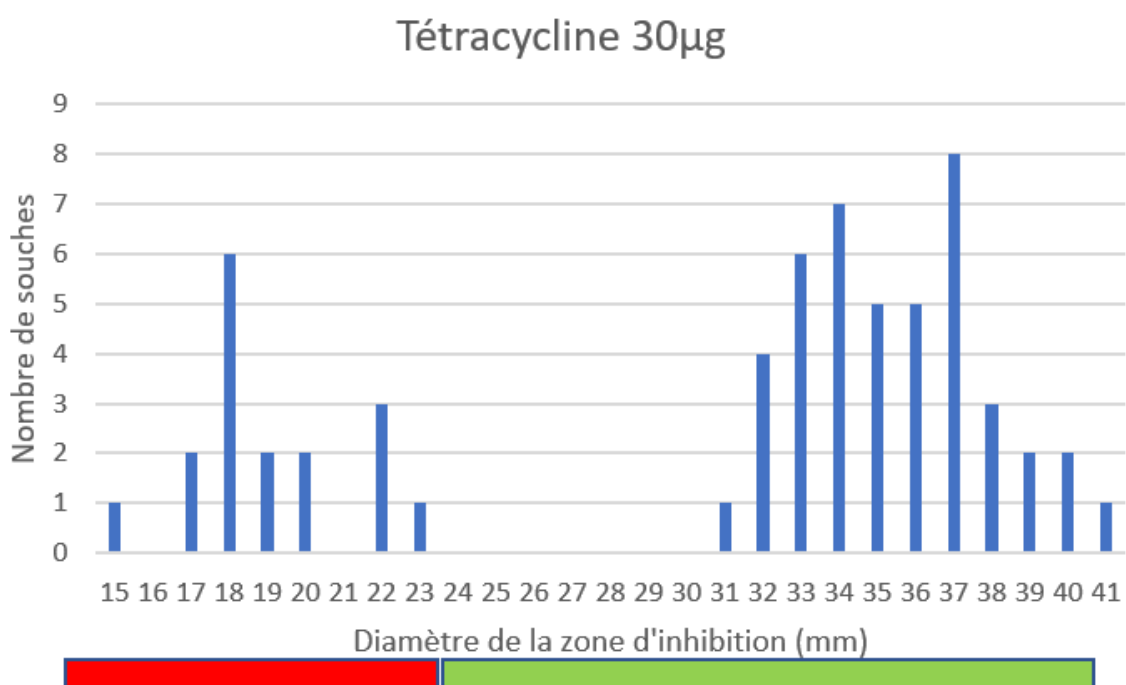


Figure 28 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la tétracycline (sensible si ≥ 24 mm).

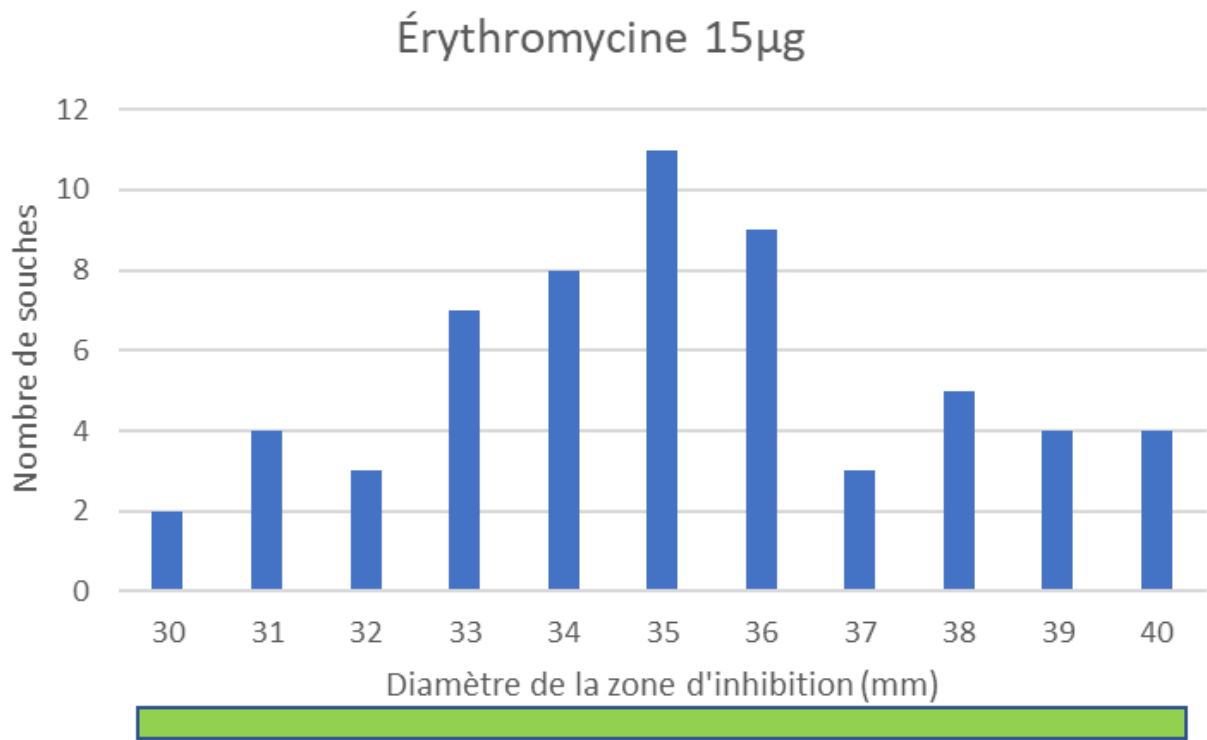


Figure 29 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour l'érythromycine, solution 0,5 McF diluée au 10ème (CASFM 2013) (sensible si ≥ 22 mm).

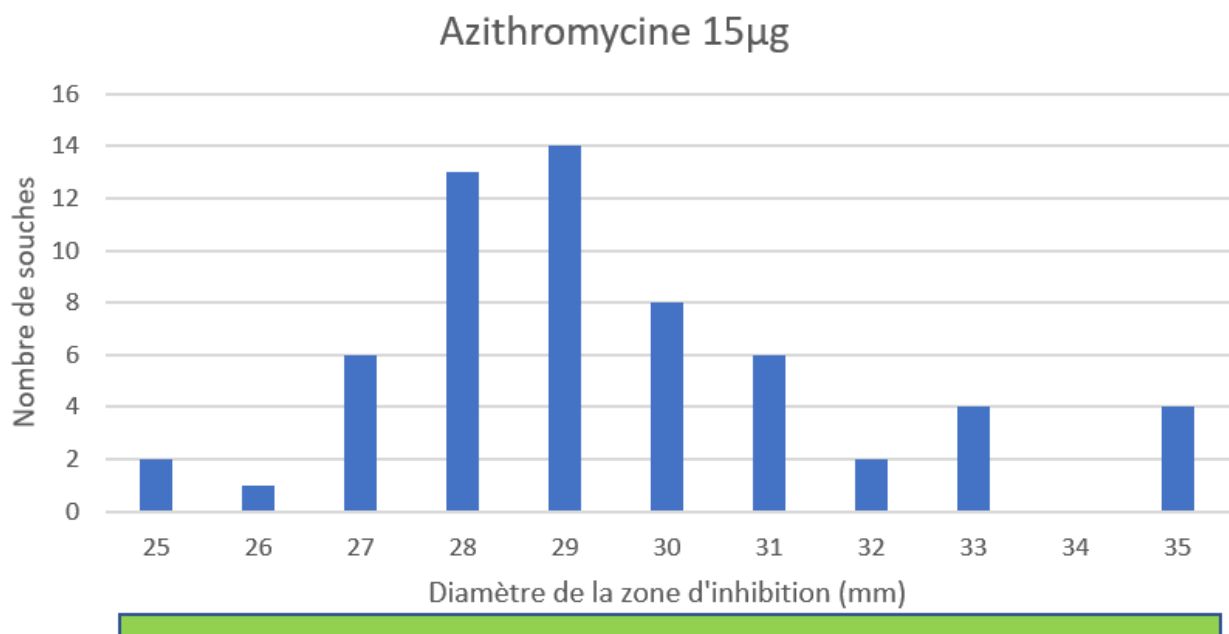


Figure 30 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour l'azithromycine, solution 0,5 McF diluée au 10ème (CASFM 2013) (sensible si ≥ 22 mm).

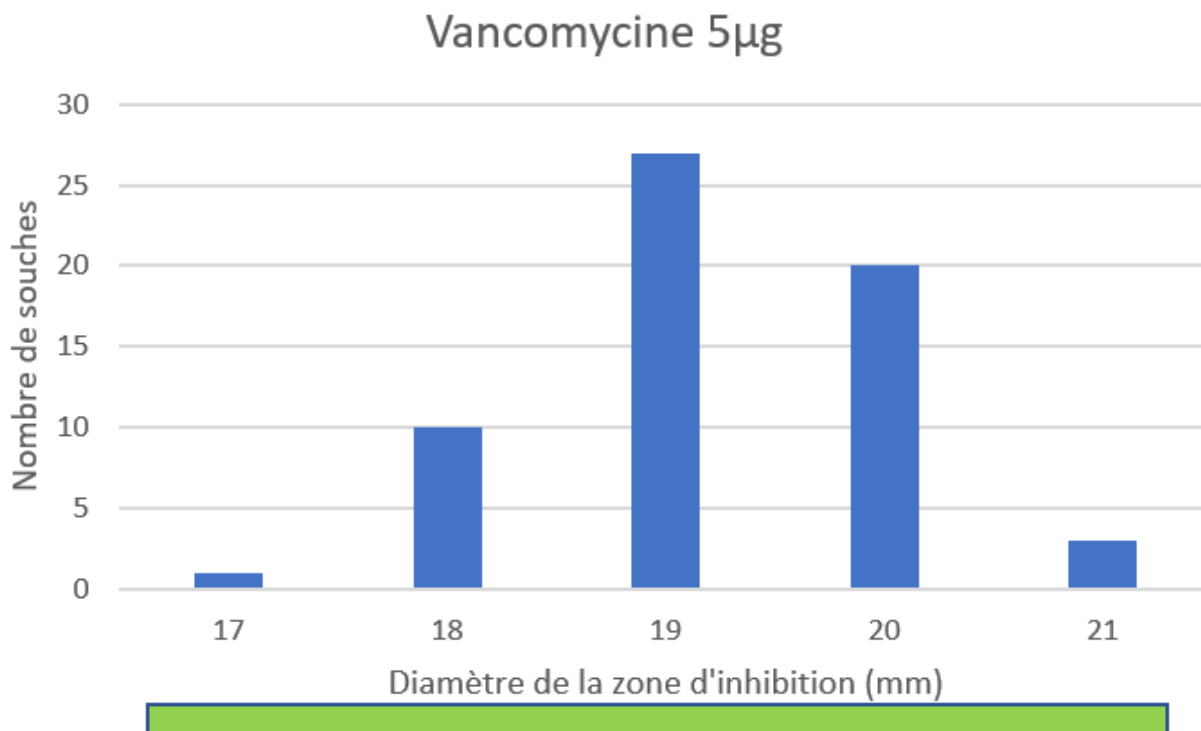


Figure 31 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la vancomycine (sensible si ≥ 17 mm).

D'autre part, les données collectées ont été synthétisées dans un tableur. Ci-après, l'exemple de la pénicilline G. Les souches sont classées par date d'isolement. La première colonne correspond à l'interprétation rendue sur l'antibiogramme au moment de sa première réalisation, les données ont été relevées dans le SIL. Les trois colonnes suivantes correspondent aux données obtenues lorsque les antibiogrammes ont été refaits. La deuxième colonne correspond à la pénicilline G testée selon le CASFM 2013. La troisième et la quatrième colonne correspondent aux données obtenues lorsque les souches ont été testées selon le CASFM 2019, en disque de 10 UI et en E-Test respectivement. Les cases apparaissent en vert lorsque l'interprétation est « sensible », en jaune lorsque l'interprétation est « intermédiaire » et en rouge lorsque l'interprétation est « résistante ». Les cas où la donnée n'est pas disponible sont en blanc (nr = non réalisé).

Date demande	Pénicilline G SIL	Pénicilline G 10 UI au 1/10 refait	Pénicilline G 1 UI refait	Penicilline G E-Test refait	Date demande	Pénicilline G SIL	Pénicilline G 10 UI au 1/10 refait	Pénicilline G 1 UI refait	Pénicilline G E-Test refait
26/05/2005	S	nr	nr	nr	25/01/2018	R	27	20	0,25
29/06/2005	nr	nr	nr	nr	31/01/2018	R	29	21	0,19
16/09/2005	S	nr	nr	nr	08/02/2018	R	30	23	0,19
12/03/2006	S	30	19	0,38	15/02/2018	R	30	24	0,125
04/04/2006	S	nr	nr	nr	08/03/2018	R	31	24	0,125
10/04/2007	S	nr	nr	nr	11/03/2018	R	29	21	0,25
18/08/2007	S	nr	nr	nr	13/03/2018	S	36	23	0,25
22/01/2008	S	nr	nr	nr	14/03/2018	R	27	22	0,19
23/01/2008	S	nr	nr	nr	21/03/2018	R	31	26	0,094
16/10/2009	S	nr	nr	nr	13/04/2018	R	27	22	0,125
01/03/2010	S	nr	nr	nr	19/07/2018	S	34	21	0,19
15/07/2010	S	nr	nr	nr	28/08/2018	R	nr	nr	nr
20/06/2011	S	nr	nr	nr	11/10/2018	I	nr	nr	nr
13/09/2014	nr	29	18	0,38	17/10/2018	R	28	20	0,25
25/10/2014	nr	30	19	0,25	26/10/2018	R	30	22	0,19
06/01/2015	nr	nr	nr	nr	08/01/2019	R	30	23	0,19
19/05/2015	S	32	20	0,19	01/02/2019	R	31	22	0,19
11/07/2015	nr	nr	nr	nr	04/02/2019	R	nr	nr	nr
23/07/2015	nr	nr	nr	nr	09/02/2019	R	32	21	0,19
20/09/2015	S	30	21	0,19	09/02/2019	R	31	19	0,19
27/05/2016	nr	nr	nr	nr	11/02/2019	R	30	20	0,25
30/05/2016	R	30	19	0,25	13/02/2019	R	29	20	0,25
11/10/2016	R	nr	nr	nr	13/02/2019	R	32	20	0,19
04/11/2016	R	36	23	0,094	13/02/2019	R	32	19	0,19
09/12/2016	R	36	23	0,125	13/02/2019	R	32	20	0,19
03/02/2017	nr	nr	nr	nr	13/02/2019	R	32	21	0,19
05/02/2017	R	34	21	0,19	14/02/2019	R	31	20	0,19
22/02/2017	R	34	20	0,125	18/02/2019	R	30	23	0,19
24/02/2017	R	35	21	0,25	18/02/2019	R	30	20	0,125
28/02/2017	R	30	21	0,19	19/02/2019	R	30	21	0,25
15/04/2017	R	29	15	0,38	19/02/2019	R	32	27	0,125
26/04/2017	R	nr	nr	nr	26/02/2019	R	31	22	0,25
02/05/2017	R	nr	nr	nr	26/02/2019	R	30	22	0,25
26/05/2017	R	30	21	0,25	08/03/2019	R	31	21	0,25
10/07/2017	R	32	23	0,19	11/03/2019	R	32	23	0,125
21/07/2017	R	27	16	0,38	01/04/2019	R	29	21	0,38
26/08/2017	R	34	23	0,19	13/04/2019	R	29	22	0,38
22/10/2017	R	30	24	0,19	19/04/2019	R	29	19	0,38
02/11/2017	R	30	22	0,125	20/04/2019	R	31	23	0,19
11/12/2017	S	36	23	0,19	10/05/2019	R	31	21	0,19
15/01/2018	R	33	22	0,19	17/05/2019	R	30	20	0,38
17/01/2018	R	29	23	0,125	27/05/2019	R	nr	nr	nr

Tableau 7 : Données d'antiorésistance de la pénicilline G.

3.3 Biologie moléculaire

3.3.1 Diversité génétique des souches

Les souches *tox-* ont été représentées par une étoile vide, celles *tox+* par une étoile pleine, rouge lorsque le test Elek était positif, orange sinon. Le biovar est représenté à côté des étoiles : vert pour *gravis*, violet pour *mitis*, jaune pour *belfanti*. Sur les trois premières colonnes, l'alternance de couleurs foncées et claires symbolise chaque changement de ST, de SL ou de genetic cluster. La colonne suivante représente le phénotype de résistance à la tétracycline : rouge pour résistant, clair pour sensible. La présence du gène *tetO* est symbolisée en orange sur la colonne suivante, son absence en clair. Les colonnes suivantes représentent pour chaque gène recherché, sa présence en bleu foncé, ou son absence en clair. Les gènes DIP0351, DIP0352, DIP0353, DIP0354, DIP0356 et DIP0357 seraient impliqués dans le métabolisme du glycogène. Les gènes *narG*, *narK*, *narI*, *narH* et *narJ* seraient impliqués dans le métabolisme des nitrates. Le gène *rbp* serait un facteur de virulence. La dernière colonne

représente les lieux d'isolement des souches : jaune : Lifou ; blanc : La province des Îles sauf Lifou ; Rouge : la province Sud ; Vert : la province Nord ; Noir : le Vanuatu et les souches de référence.

Les 58 souches étudiées appartiennent à 13 sous-lignées différentes (les trois souches de référence incluses appartiennent à trois sous-lignées supplémentaires). Parmi eux, deux sous-lignées sont particulièrement représentées :

Le sous-lignée 43, appartenant au ST228, représente 21 souches sur 58, soit 36,2 % de nos souches étudiées.

Le sous-lignée 82, appartenant au ST416, représente 16 souches sur 58, soit 27,5 % de nos souches étudiées.

Le sous-lignée 227, appartenant au ST120, représente 5 souches sur 58, soit 8,6 % de nos souches étudiées.

Le gène *tetO* est détecté uniquement chez les 16 souches du sous-lignée 82 et représente donc 27,5 % des souches étudiées.

Les gènes DIP0351, DIP0354 et DIP0357 ont été détectés chez 42 souches, les gènes DIP0352 et DIP0353 chez 57 souches et le gène DIP0356 chez 44 souches.

Les gènes *narG narK narI* et *narJ* ont été détectés chez 48 souches, le gène *narH* chez 57 souches.

Le gène *rbp-like* a été détecté chez 41 souches.

Les souches ont été isolées de différentes provinces : 6 souches proviennent de la province Nord, 31 de la province Sud, 20 de la province des Îles, dont 15 de Lifou.



Figure 32 : Arbre phylogénétique des souches étudiées.

4. Quatrième partie : discussion

4.1 Répartition des souches dans l'espace et dans le temps

4.1.1 Répartition géographique des souches

La répartition des cas de diphtérie sur le territoire néo-calédonien est assez inégale, avec 22 cas (26,8 %) pour Nouméa et 18 cas (22 %) pour Lifou parmi les 84 souches néo-calédoniennes étudiées. Ceci peut s'expliquer d'une part par la répartition géographique de la population : une grande densité de population est présente à Nouméa (34,7 % de la population) et dans la province Sud, alors que la province Nord et celle des îles sont moins peuplées (6).

D'autre part, les souches isolées ont été plus facilement détectées depuis l'arrivée du Maldi-TOF et seuls les laboratoires du CHT et de Calédobio en sont équipés. Ces deux laboratoires sont les plus importants de Nouvelle-Calédonie et sont tous les deux installés en province Sud. Enfin, Calédobio réalise les analyses des îles dont fait partie Lifou.

Enfin, le CMS de Lifou prélevait régulièrement des plaies d'évolution défavorable afin d'avoir une documentation bactériologique, alors que les autres centres ne le faisaient pas, ou de manière beaucoup moins systématique. Cela explique probablement la surreprésentation des cas à Lifou, alors que le nombre de personnes y habitant est plus faible (9 195 habitants en 2019 soit, 3,4 % de la population néo-calédonienne).

4.1.2 Augmentation de l'incidence

Avant l'arrivée du Maldi-TOF, les corynebactéries présentes dans des prélèvements de plaies cutanées ou des prélèvements peu profonds n'étaient pas identifiées jusqu'au nom de l'espèce. Depuis l'arrivée du Maldi-TOF, l'identification étant plus facile, ces souches sont mieux détectées. L'augmentation du nombre de cas annuel de diphtérie à partir de fin 2014 est probablement liée à ce biais de détection. Le laboratoire du CHT s'est équipé en septembre 2014 et celui de Calédobio en décembre 2016.

En parallèle, la population néo-calédonienne n'a que très légèrement augmenté et ne peut pas expliquer à elle seule une telle augmentation du nombre de cas détectés sur le territoire.

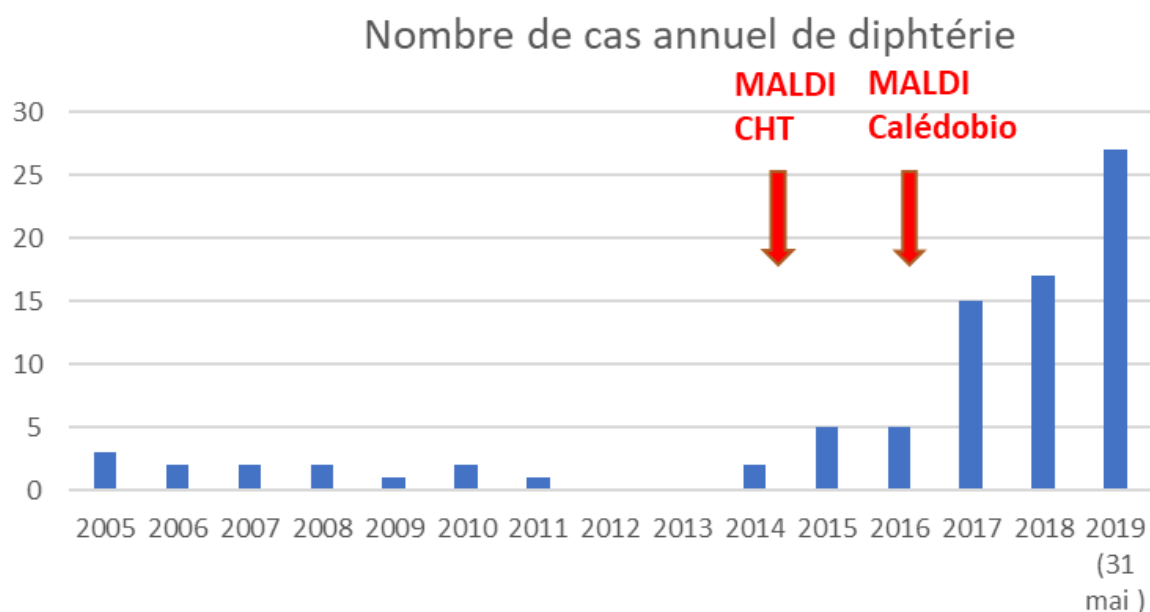


Figure 33 : Évolution du nombre de cas annuels de diphtérie et dates d'arrivée des deux Maldi-TOF sur le territoire.

4.2 Étude de l'antibiorésistance

Le tableau suivant résume, pour les antibiotiques testés dans cette étude, les différences d'interprétation entre les CASFM 2013 et 2019. En 2013, il n'y avait pas de recommandations spécifiques pour les corynebactéries. On se basait donc sur les seuils définis pour chaque antibiotique sans considération de l'espèce. Les conditions analytiques n'étaient pas les mêmes qu'en 2019 : une solution de 0,5 McF était diluée au 1/10 avant d'être utilisée pour la réalisation de l'antibiogramme. En 2019, cette solution est utilisée telle quelle. La suspension bactérienne était donc moins chargée en 2013 qu'en 2019, ce qui peut potentiellement conduire à des diamètres de zone d'inhibition légèrement plus grands. Une étude réalisée sur *C. diphtheriae* montre qu'en pratique, la charge de l'inoculum n'impacte pas les diamètres des zones d'inhibition (66). L'impact de la différence d'inoculum entre les versions 2013 et 2019 du CASFM est donc à relativiser. Ensuite, les charges des disques utilisés ne sont pas toujours les mêmes. Lorsque les charges des disques antibiotiques ont changé, cela s'est effectué à la baisse, ce qui doit conduire normalement à des diamètres de zones d'inhibition plus petits en 2019 qu'en 2013. Enfin, les seuils d'interprétation ne sont pas toujours les mêmes non plus. Lorsque les diamètres d'interprétation ont changé, ils sont plus grands, alors même que les charges des disques d'antibiotiques ont diminué parfois (gentamicine, rifampicine). Ces évolutions tendent à interpréter les mêmes souches globalement plus résistantes au fil du temps si l'on ne considère que l'interprétation rendue. C'est en particulier ce qui a été observé pour la pénicilline G, cf. tableau 7 dans le chapitre résultats. On observe que ce changement est visible à partir de fin 2015. Les recommandations du CASFM ont énormément changé entre 2013 et 2014 car elles ont été rédigées de manière conjointe avec l'european committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). Ces changements ont eu une répercussion sur la manière même de réaliser des antibiogrammes, sur les charges utilisées et sur les seuils d'interprétation. Les nouvelles recommandations ont été publiées en mai 2014 et ont été prises en compte un peu plus d'un an plus tard, le temps de modifier les protocoles du laboratoire.

Antibiotique	2013			2019		
	charge	résistant <	sensible ≥	charge	résistant <	sensible ≥
Pénicilline G	6 µg 10 UI	18	29	1 UI		29
Gentamicine	15 µg 10 UI	16	18	10 µg 6 UI		23
Tétracycline	30 UI 30 µg	17	19	30 UI 30 µg		24
Érythromycine	15 UI	17	22			
Azithroycine	15 µg	17	22			
Clindamycine	2 UI		15	2 µg		20
Vancomycine	30 µg		17	5 µg		17
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	1,25-23,75 µg	10	16	1,25-23,75 µg	16	19
Ciprofloxacine	5 µg	22	25	5 µg		25
Rifampicine	30 µg	14	19	5 µg	25	30

Tableau 8 : Comparaison des CASFM 2013 et 2019 pour *C. diphtheriae*.

Les graphiques présentés dans la partie « résultats » montrent pour beaucoup d'antibiotiques une répartition gaussienne des souches. Lors de la détermination de seuils écologiques, on regarde la répartition de la population au regard de diamètres d'inhibition vis-à-vis d'un antibiotique donné. En général, une population dite « sauvage » ressort, avec des CMI ou des diamètres d'inhibition répartis de manière gaussienne. Lorsqu'un mécanisme de résistance est acquis par une partie de la population bactérienne, on observe à une CMI plus élevée ou à un diamètre d'inhibition plus faible, une deuxième population qui se détache de la première. Les seuils de détermination « sensible » « intermédiaire » et « résistant » sont déterminés pour coller au mieux à cette répartition et catégoriser les bactéries ayant acquis un mécanisme de résistance en « résistant » ou a minima en « intermédiaire » selon le niveau de cette résistance.

Ce phénomène est particulièrement bien illustré dans notre population lorsque l'on s'intéresse à la tétracycline. En étudiant la répartition des diamètres d'inhibition, le seuil choisi par le CASFM à 24 mm ne paraît pas optimal. En effet, une souche dont le diamètre d'inhibition serait de 24 mm serait alors catégorisée comme sensible, avec un risque important que la souche ait acquis un mécanisme de résistance vis-à-vis de la tétracycline. Si l'on considère uniquement nos souches de *C. diphtheriae* de Nouvelle-Calédonie, un seuil autour de 27 mm paraît plus adapté, voire un seuil à 29 ou 30 mm, pour éviter de conclure à tort à une souche sensible, quitte à conclure plus souvent à tort à une souche résistante. Les seuils n'ont pas été déterminés pour la seule espèce *Corynebacterium diphtheriae*, mais pour l'ensemble des corynebactéries. Il est donc normal que certains seuils ne soient pas adaptés dans le cas de notre étude, qui est plus spécifique. De plus, notre échantillonnage étant réduit tant en nombre de souches qu'en diversité de provenance, il n'est probablement pas adapté pour la détermination de tels seuils.

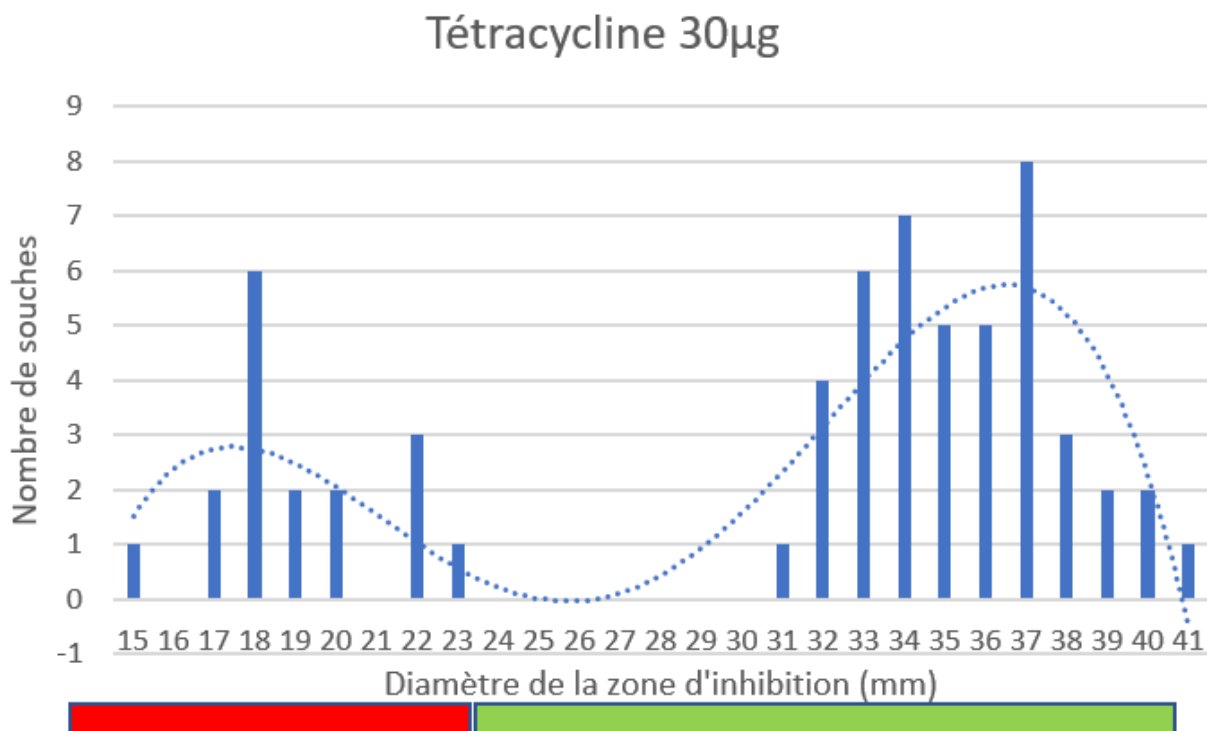


Figure 34 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la tétracycline.

Pour la pénicilline G, on observe que le seuil (29 mm) utilisé par le CASFM 2019 pour classer une souche sensible, classe de facto toutes les souches étudiées en « résistantes », ce qui n'est pas le cas lorsque l'on teste en E-test (toujours en se référant à la version 2019). Le seuil écologique dans notre étude semble plutôt se situer autour de 17 mm.

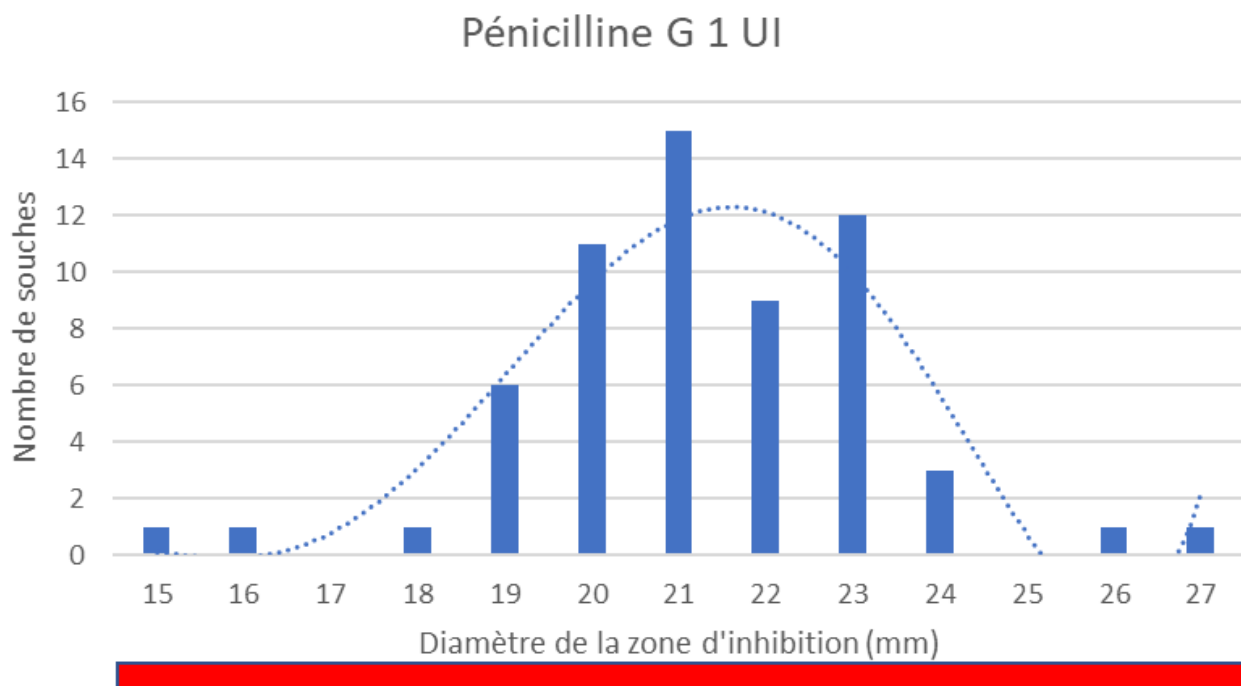


Figure 35 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la pénicilline G.

A l'inverse, l'utilisation de la version 2013 du CASFM classait presque toutes les souches de cette étude en « sensible » et seulement quelques-unes en « intermédiaire ».

Ainsi, si on ne regarde que la catégorisation des souches en « sensible », « intermédiaire » et « résistant », on a l'impression que les souches deviennent de plus en plus résistantes dans le temps, alors que si on les teste toutes avec le même référentiel, cela n'est pas vrai.

La même constatation suite à un changement des seuils d'interprétation du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) a été observée au Canada. Le seuil de sensibilité étant passé en 2015 de 1 mg/L à 0,12 mg/L, les souches étaient en grande majorité interprétées comme intermédiaires après ce changement, alors qu'elles étaient toutes interprétées comme sensibles avant. Une recherche par NGS de gènes de résistance pour les bêtalactamines parmi les souches testées n'avait pas mis en évidence de gène de résistance (37).

Il y a un danger à catégoriser trop souvent les souches comme intermédiaires ou résistantes à la pénicilline. En effet, le clinicien sera alors tenté d'utiliser en probabiliste les macrolides alors même que la résistance aux macrolides est plus fréquente. De plus, beaucoup d'échantillons sont plurimicrobiens avec présence associée de *Streptococcus pyogenes*. La prescription de pénicilline G paraît donc optimale pour traiter au mieux ces cas. Enfin la prescription d'un macrolide élargit le spectre tout en étant pourvoyeur de plus d'effets secondaires (37).

La classe d'antibiotiques préconisée en cas d'infection à *C. diphtheriae* et d'allergie aux bêtalactamines est celle des macrolides. Curieusement, la version 2019 du CASFM ne propose pas de seuils pour tester les souches de corynebactéries vis-à-vis de cette classe d'antibiotiques. Étant donné l'importance clinique de cette classe pour cette espèce, le laboratoire du CHT a fait le choix d'utiliser les référentiels de 2013 pour pouvoir apporter au clinicien une réponse quant à la sensibilité des souches vis-à-vis des macrolides.

De la même manière, pour l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (cotrimoxazole), les seuils définis par le CASFM 2019 sont les suivants : souche résistante si diamètre inférieur à 16 mm, intermédiaire entre 16 et 19 mm et sensible si le diamètre est supérieur ou égal à 19 mm. Or une majorité de nos souches présentent des diamètres de zone d'inhibition autour d'un disque de cotrimoxazole supérieur ou égal à 29 mm et presque toutes supérieur ou égale à 24 mm. Le seuil de 19 mm paraît donc trop bas pour cet antibiotique au regard de notre population.

Une étude à plus grande échelle (45) sur uniquement l'espèce *Corynebacterium diphtheriae* retrouve les mêmes résultats pour le cotrimoxazole, les auteurs proposent un seuil « écologique » à 24 mm, meilleur reflet de la répartition naturelle des souches.

Triméthoprim-sulfaméthoxazole 1,25-23,75 µg

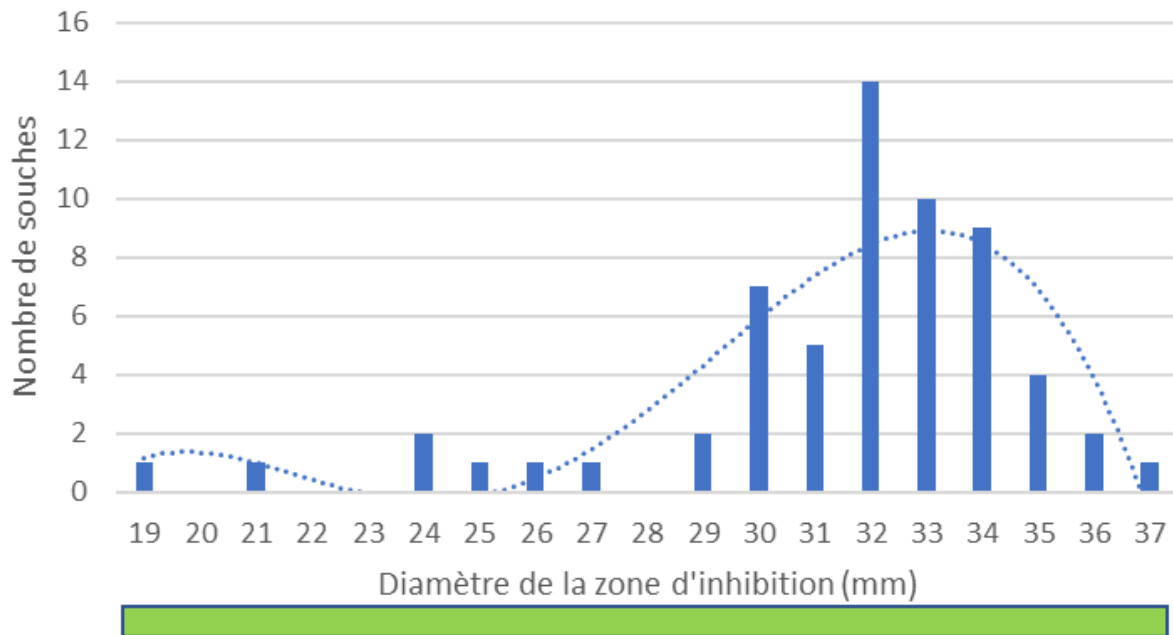


Figure 36 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour le triméthoprim-sulfaméthoxazole.

En ce qui concerne la gentamicine, toutes nos souches présentent des diamètres de zone d'inhibition compris entre 16 mm et 23 mm. Le seuil défini par le CASFM 2019 pour la gentamicine est fixé à 23 mm ou plus pour une souche sensible. Nous avons donc une majorité de souches qui ressortent « résistantes », ce qui n'est pas le cas lorsque l'on regarde d'autres études (45). On ne peut pas exclure qu'il y ait eu des erreurs sur la charge du disque utilisé : 10 UI et non 10 µg, ce qui ferait une charge de 15 µg et augmenterait la taille des diamètres observés. Cette hypothèse a été étudiée mais nous n'avons pas relevé d'erreur après contrôle. Nous n'avons pas trouvé d'explication à cette différence de diamètre observée uniquement pour cet antibiotique. Nos souches ressortiraient sensibles si l'on considérait le seuil écologique de 10 mm proposé par cet article (45), mais ressortent en majorité résistantes en suivant le CASFM.

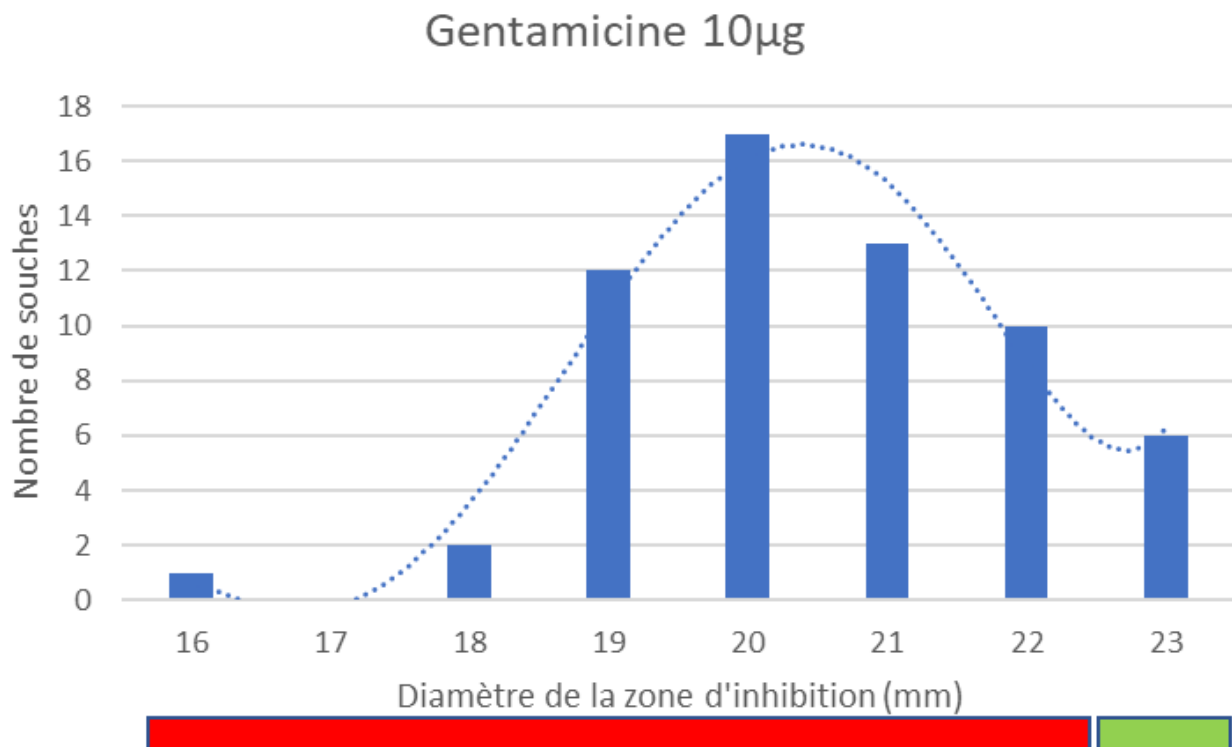


Figure 37 : Répartition des diamètres des zones d'inhibition pour la gentamicine.

4.3 Biologie moléculaire

4.3.1 Relation phénotype génotype

4.3.1.1 Toxine diphtérique

La présence du gène *tox* détecté en PCR point final a été confirmée par WGS pour toutes nos souches. Les résultats sont conformes à ce qui était attendu, les deux techniques PCR point final et WGS sont bien corrélées.

En ce qui concerne le cluster de 5 cas *tox+*, deux cas présentaient un test Elek négatif expérimentalement (souches dites non-toxigenic *tox*-bearing (NTTB)) tandis que les trois autres exprimaient bien le gène de la toxine (test Elek positif). Ce résultat étonnant nous a poussé à rechercher une explication à cette différence au sein d'un même cluster. Le gène de la toxine a été plus particulièrement étudié à la recherche de mutations (impliquant le changement d'un acide aminé, ou l'apparition d'un codon stop) dans le gène de la toxine. Il a été retrouvé une mutation impliquant un changement de l'acide aminé T (thréonine) classiquement décrit pour l'acide aminé I (Isoleucine), à la position 350. Cette mutation a été retrouvée dans les cinq souches du cluster, elle n'explique donc pas la discordance de résultat du test Elek.

La même étude a été réalisée sur le gène *dtxR*, qui est le promoteur du gène *tox*. Il est parfois responsable d'une absence d'expression du gène *tox*. Il n'a pas été retrouvé d'anomalie sur ce promoteur et les séquences étaient identiques pour les cinq souches du cluster.

Face à l'absence d'explication génomique d'une part et le lien épidémiologique très étroit entre ces cinq souches d'autre part, les résultats discordants du test Elek sont très surprenants. On ne peut pas exclure une souche exprimant faiblement la toxine et présentant donc des résultats variables du test Elek.

4.3.1.2 Résistance aux antibiotiques

Toutes les souches où le gène *tetO* a été retrouvé sont résistantes à la tétracycline. Ce gène code pour une protéine protégeant le ribosome de l'action de la tétracycline, permettant la traduction même en présence d'une concentration intracellulaire en tétracycline importante.

Parmi les souches où le gène *tetO* n'a pas été retrouvé, seulement une souche est résistante : la souche FRC0758 (le diamètre de la zone d'inhibition de la tétracycline vérifié à deux reprises est égal à 18 mm pour un seuil de sensibilité à 24 mm). Le mécanisme de résistance reste inconnu au niveau de l'analyse génomique. En effet, les marqueurs retrouvés habituellement pour la résistance à la tétracycline, comme les gènes *tetO*, *tet33*, *tetZ* ou *tetW* n'ont pas été retrouvés par BLAST dans le génome de cette souche. Tout n'est pas encore connu sur la résistance à la tétracycline et il est possible qu'à l'avenir un gène présent dans le génome de cette souche soit identifié comme conférant une résistance à la tétracycline.

4.3.1.3 Biovars

En ce qui concerne le biovar des souches, nous nous sommes intéressés à la relation entre le gène *spuA* et le biovar *gravis* d'une part et le gène *narG* et le biovar *belfanti* d'autre part.

On trouve une forte corrélation entre la présence de l'ensemble des gènes DIP0351, DIP0352, DIP0353, DIP0354, DIP0356 et DIP0357 (*spuA*) et le biovar *gravis* (cf. figure 38). En revanche, certaines souches *gravis* ne comportent pas cet îlot en entier. Il est possible que d'autres gènes participent à leur phénotype sans que l'on soit parvenu à les identifier. Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats déjà publiés (52).

Nous avons deux souches présentant un phénotype correspondant au biovar *belfanti* dans notre étude : FRC0723 et FRC0748. La souche FRC0723 est bien retrouvée comme appartenant à l'espèce *Corynebacterium belfantii* et la recherche du gène *narG* est négative pour cette souche. La souche FRC0748 appartient en revanche à l'espèce *Corynebacterium diphtheriae* (forte corrélation). Cette souche se trouve dans l'embranchement correspondant à la lignée *mitis*. Le gène *narG* est retrouvé pour cette souche et la perte de la fonction nitrate réductase responsable du phénotype *belfanti* pour cette bactérie n'a pas été expliquée.

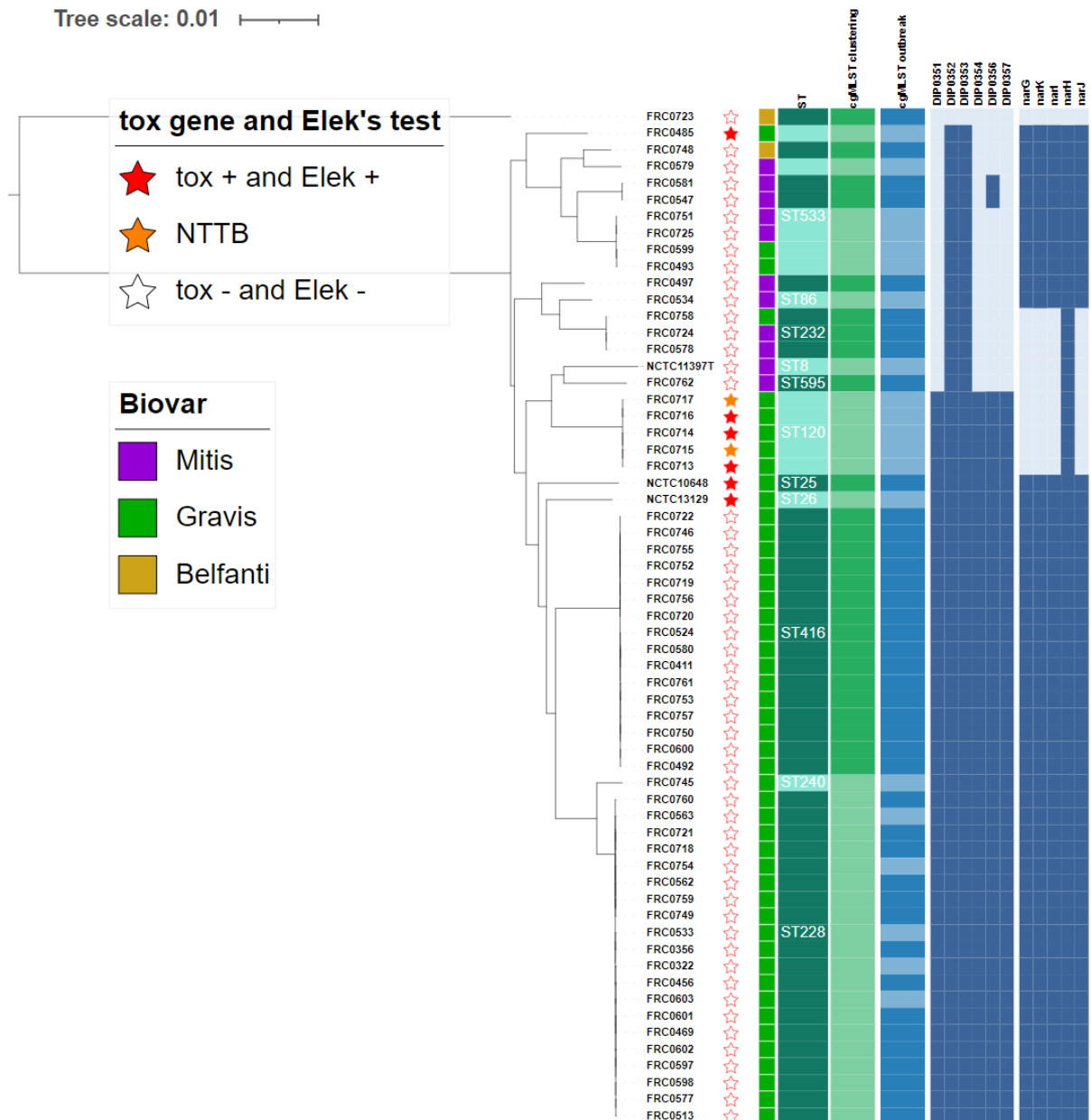


Figure 38 : répartition des gènes codant pour le métabolisme bactérien au sein de la cohorte.

4.3.2 Diversité des souches néo-calédoniennes

La réalisation de l'arbre phylogénétique a permis de se rendre compte des liens entre les souches. Deux groupes de souches (correspondant à des cas contacts autour d'un épisode index différent) ont été étudiés, l'un symbolisé en rouge sur la figure suivante, l'autre en jaune. Les souches du premier groupe étaient bien liées génétiquement en plus de l'être épidémiologiquement : il s'agit du cluster de 5 cas *tox+*. Dans le deuxième groupe (deux cas *tox-* : FRC0492 et FRC 0493), les souches n'étaient en fait pas liées génétiquement : une souche est dans la lignée *gravis*, l'autre dans la lignée *mitis* (bien qu'ayant un phénotype *gravis*), elles appartiennent à des ST et SL différents. Ce que l'on pensait être une transmission n'était donc qu'un portage asymptomatique d'une autre souche de diphtérie co-circulante.

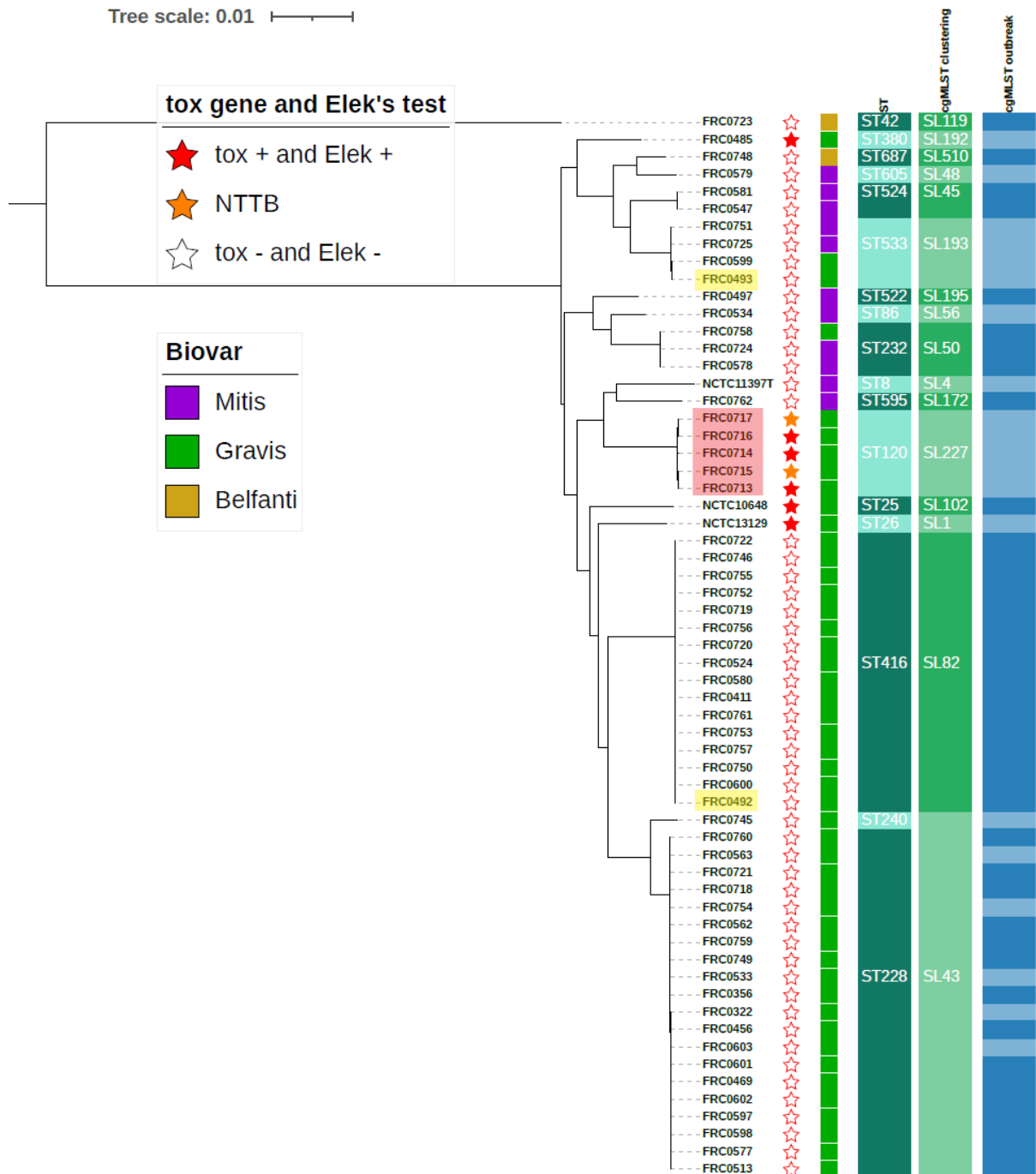


Figure 39 : Répartition des deux clusters investigués dans l'arbre phylogénétique.

Curieusement, la diversité des souches néo-calédoniennes est moins importante que ce qui est décrit pour d'autres régions. En effet, plus de 60 % des souches appartiennent à seulement deux souslineages :

Le souslineage 43 représentant 36,2 % de notre échantillon (21 souches sur les 58 de l'étude) a déjà été décrit ailleurs dans le monde, mais de façon sporadique. Sur l'ensemble des données publiées et accessibles au niveau mondial (plus de 600 génomes), seules neuf souches isolées hors de Nouvelle-Calédonie partagent ce souslineage, alors qu'il en a été isolé 33 en Nouvelle-Calédonie (données de cette étude et les souches néo-calédoniennes envoyées après la période d'inclusion de ce travail). Voici leurs provenances :

Une souche ancienne isolée en 1966 et servant de référence pour le ribotypage isolée en Roumanie, deux souches australiennes isolées respectivement en 2013 et 2016, deux souches françaises isolées en 2011 et 2021, une souche de Wallis et Futuna isolée en 2012 et trois souches de Polynésie française, isolées en 2017, 2019 et 2020.

Le sous-ligneage 82 représentant 27,5 % de notre échantillon (16 souches sur les 58 de l'étude) n'a été retrouvé que chez une seule souche, isolée en France chez un patient revenant de Tahiti. En revanche, il a été isolé 26 fois en Nouvelle-Calédonie (données de cette étude et postérieures). Ce sous-ligneage est le seul de notre cohorte à porter le gène *tetO* conférant la résistance à la tétracycline. Autre particularité qu'il partage avec la souche de *C. belafantii* (éloignée phylogénétiquement du reste de la cohorte), ce sous-ligneage 82 ne porte pas le facteur de virulence *rbp* alors qu'il est présent chez toutes les autres souches de *C. diphtheriae*.

Le sous-ligneage 227, auquel appartiennent les cinq souches du cluster *tox+*, n'a été retrouvé que chez deux autres souches, une isolée en 1995 en Finlande et une isolée de 2015 en Australie.

Cette forte représentation de seulement quelques sous-ligneages pourrait être mise en relation avec le caractère insulaire du territoire. Seules quelques souches ont pu diffuser sur le territoire et s'y sont répandues largement, donnant une diversité génétique moindre que sur le continent où la maladie évolue probablement depuis plusieurs milliers d'années. Comme ce qui est observé pour d'autres pathogènes (*Burkholderia pseudomallei* (67)), les sous-ligneages prédominants semblent provenir soit des territoires géographiquement proches (Polynésie, Australie), soit de France métropolitaine.

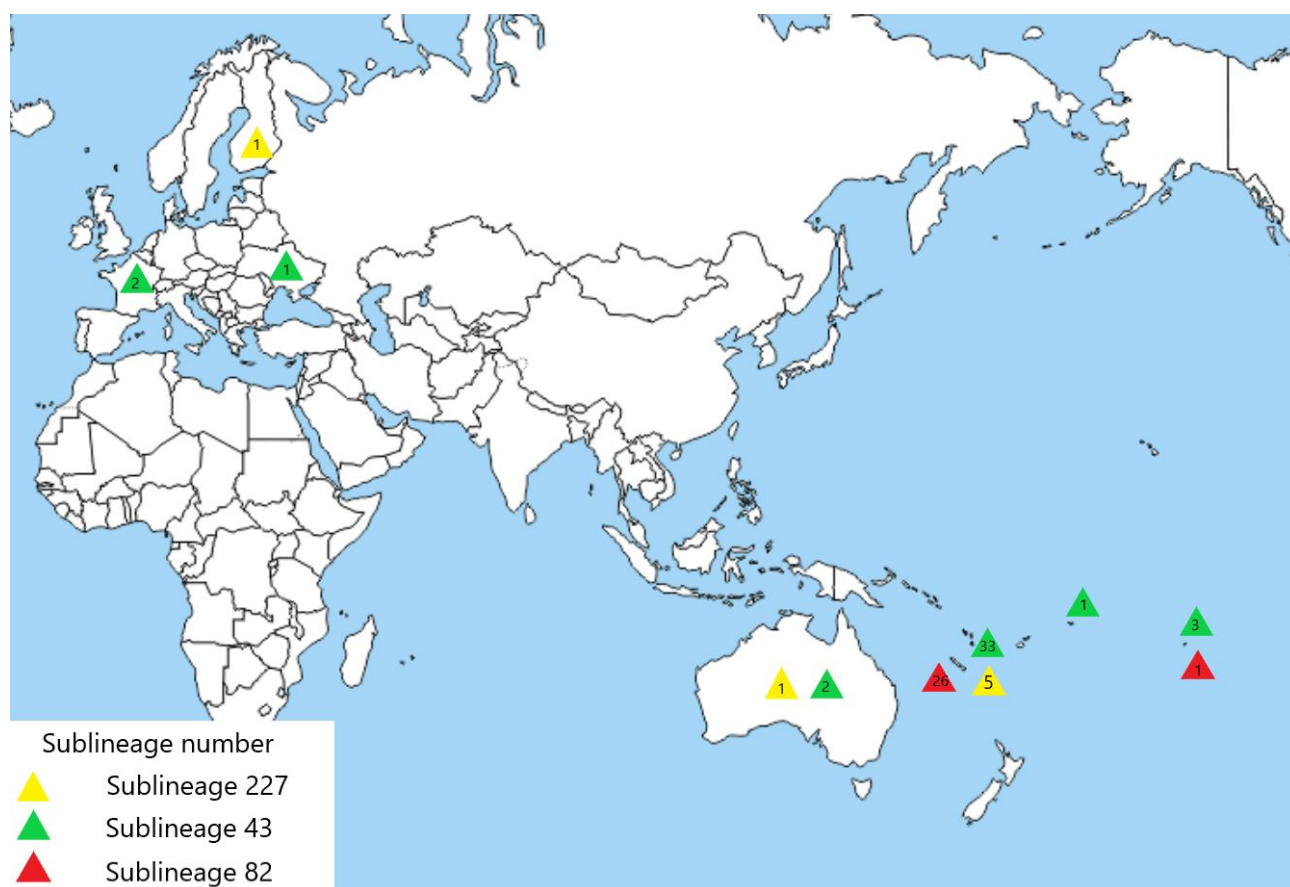


Figure 40 : Localisations des trois principaux sous-ligneages retrouvés en Nouvelle-Calédonie.

4.4 Données cliniques

4.4.1 Endocardites

Sur les 84 cas étudiés, 9 isollements provenaient d'hémocultures, dont 6 étaient révélatrices d'une endocardite infectieuse. Les cas d'endocardite à *C. diphtheriae* sont décrits depuis longtemps. Dans la littérature, ils surviennent fréquemment chez des patients ayant des prédispositions ou terrain favorisant, mais pas seulement. En effet, il n'a pas été retrouvé de facteur de prédisposition chez une large proportion de patients. Les facteurs de prédisposition fréquemment retrouvés sont des maladies cardiaques préexistantes, des valves prothétiques et l'usage de drogues par voie intraveineuse. Les cas d'endocardite à *C. diphtheriae* ont plus souvent été décrits chez des hommes que chez des femmes et chez des sujets globalement plus jeunes que ce qui est décrit pour d'autres germes. Les souches peuvent porter ou non le gène de la toxine diphtérique, mais les cas d'endocardites à souche *tox* négative sont majoritaires depuis que la couverture vaccinale mondiale a considérablement augmenté (29).

Sur les six cas d'endocardite de cette étude, il y avait quatre personnes de sexe féminin et deux personnes de sexe masculin. Il y avait trois enfants (une fille de cinq ans, une fille de neuf ans et un garçon de neuf ans) et trois adultes (une femme de 23 ans, une femme de 30 ans et un homme de 65 ans). Tous les patients présentaient des facteurs de risques d'endocardite infectieuse. Le patient le plus âgé avait de nombreux facteurs de comorbidité cardiovasculaire : bronchopneumopathie chronique obstructive post-tabagique avec 80 paquets-année (sevré), antécédents de consommation d'alcool (sevré), surcharge pondérale, sonde de pace maker posée 10 ans avant la survenue de cet épisode. Les cinq cas les plus jeunes avaient des antécédents de rhumatisme articulaire aigu (RAA), pathologie fréquente en Nouvelle-Calédonie (68–70). Le RAA est un syndrome auto-immun postinfectieux, faisant classiquement suite à une angine à streptocoques du groupe A et induisant une réponse immunitaire inappropriée, avec en particulier une cardite. La cardiopathie rhumatismale, conséquence du RAA, est la première cause d'insuffisance cardiaque chez les enfants et jeunes adultes dans les pays émergents. Les valves cardiaques ainsi endommagées deviennent des facteurs de risque pour de nombreuses maladies cardiaques, dont les endocardites infectieuses. On note une prédominance féminine de cette maladie et également une incidence plus élevée dans les populations mélanésiennes et polynésiennes. Les populations mélanésiennes et polynésiennes sont plus à risque de développer des endocardites infectieuses que les populations d'origine européenne en Nouvelle-Calédonie (71). La Nouvelle-Calédonie est un territoire où une partie de la population est particulièrement sensible aux endocardites infectieuses et où *C. diphtheriae* circule, ce qui explique la survenue de ces 5 cas d'endocardites chez des sujets jeunes ayant tous des antécédents de rhumatisme articulaire aigu.

4.4.2 Colonisation des plaies

La moitié de nos souches ont été isolées de manière concomitante avec du *S. aureus* ou du *S. pyogenes* et 70 % avec au moins une de ces deux bactéries. Lorsqu'on s'intéresse plus spécifiquement aux atteintes cutanées, ce pourcentage monte à environ 60 % pour chacun des deux

germes et 84 % pour au moins l'un des deux, 94,2 % avec au moins une autre bactérie retrouvée (souvent des streptocoques, des entérobactéries ou des bacilles Gram négatifs non fermentant).

Ces résultats, alliés au fait qu'il s'agit dans une grande majorité de souches non toxigènes, tendent à relativiser le pouvoir pathogène de *C. diphtheriae* dans les infections cutanées. Le germe *C. diphtheriae* est-il en soit pathogène, ou il y a-t-il une colonisation d'une infection préexistante, provoquée par une autre bactérie, (*S. aureus*, *S. pyogenes*...) ? Si c'est le cas, la situation est-elle synergique pour les différents germes et participe-t-elle donc à une augmentation de la gravité des infections, par rapport à la même infection sans *C. diphtheriae* ?

4.4.3 Portage asymptomatique

C. diphtheriae colonise-t-il également la peau saine et serait-il alors retrouvé par hasard lors de prélèvement de plaies infectées, sans jouer le moindre rôle pathogène de lui-même ? Des études de portage au niveau cutané seraient nécessaires pour répondre à cette question. Il serait alors intéressant de mettre en relation le pourcentage de portage sain cutané avec le pourcentage de plaies prélevées où *C. diphtheriae* est retrouvé. Si les pourcentages ne diffèrent pas significativement, on peut considérer qu'il n'y a pas de rôle pathogène en soit et que *C. diphtheriae* n'est retrouvé que parce que la personne porte ce germe au niveau de sa flore. Si au contraire le pourcentage de plaies infectées avec *C. diphtheriae* est bien plus important que le pourcentage de portage, ce serait plus en faveur d'un rôle pathogène de *C. diphtheriae*.

Le fait que les souches FRC0492 et FRC0493, prélevées chez un cas index et un de ses contacts, ne soient pas reliées génétiquement, montre que lorsque l'on recherche chez des personnes asymptomatiques le portage de *C. diphtheriae*, ce portage sain existe, en dehors d'une situation épidémique. Ce type de portage passe sous les radars et n'aurait pas été mis en évidence sans l'enquête autour du cas d'une part et l'analyse des données génétiques d'autre part. Ce cas unique ne doit pas conduire à des conclusions hâtives, mais reste intéressant et des études futures seraient utiles pour connaître le pourcentage de la population portant ou non *C. diphtheriae* au niveau ORL d'une part et au niveau cutané d'autre part.

Dans tous les cas, un portage sain est synonyme de réservoir potentiel si jamais une souche porteuse du corynebactériophage β venait à diffuser sur le territoire et doit d'autant plus encourager à un maintien d'un excellent niveau de vaccination antidiphthérique de la population.

4.5 Hygiène hospitalière

Au sein de l'hôpital, de multiples situations peuvent mener à la mise en place de précautions complémentaires contact gouttelettes (PCC-gouttelettes). Au CHT, les PCC-gouttelettes sont en général appliquées lorsqu'un patient est porteur de bactéries multi résistantes (BMR) au niveau pulmonaire. Elles sont appliquées pendant toute la durée de l'hospitalisation. Le patient doit porter un masque chirurgical lors de tous ses déplacements hors de sa chambre. Le personnel et les visiteurs également s'il y a des soins rapprochés (moins d'un mètre). Un tablier devra être ajouté pour les contacts (soins mouillants) avec le patient. Le personnel et les visiteurs doivent réaliser une friction hydroalcoolique des mains avant d'entrer dans la chambre et en sortant. Le personnel (brancardiers,

radiologie, ambulancier...) doit être informé des PCC-gouttelettes en cas de sortie même temporaire du service. La chambre et le matériel en contact avec le patient sont nettoyés avec un produit détergent-désinfectant.

Ces précautions sont également mises en place lors de toute suspicion de maladie respiratoire transmissible, dont la diphtérie (germe porteur du gène de la toxine diphtérique) fait partie. Ces précautions permettent de limiter la diffusion de la maladie. Elles sont mises en place dès la suspicion, en attendant le résultat de la recherche du gène de la toxine diphtérique et levées si celle-ci s'avère négative. Le suivi et l'application stricte de ces mesures sont primordiaux afin de limiter la diffusion de germes hautement contagieux et virulents. Cela nécessite du personnel formé, des locaux adaptés (chambres individuelles) et la coopération des équipes d'hygiène et des services cliniques. Au CHT, un service de cohorting a même été mis en place au fond du service d'orthopédie pour limiter la diffusion des bactéries hautement résistantes (BHR). Les IDE sont particulièrement sensibilisé(e)s aux problématiques d'hygiène et sont expérimenté(e)s. Les patients porteurs de germes à risque d'émergence (BHR) sont transférés dans ce service si possible (sauf réanimation et pédiatrie) pour une meilleure prise en charge. De façon exceptionnelle, c'est dans ce service que les cas adultes porteurs de *C. diphtheriae tox+* ont été hospitalisés en attente de la levée de leur isolement (après deux contrôles revenus négatifs à 24 heures d'intervalle, 24 heures après la fin de l'antibiothérapie). Cet événement a montré l'intérêt d'avoir des équipes formées, un lieu dédié et des procédures en place en cas de survenue d'une telle situation.

4.6 Vanuatu

Lors des deux seuls épisodes de diphtérie porteuse du gène *tox*, les patients revenaient à chaque fois du Vanuatu. Cela pourrait s'expliquer par une moins bonne couverture vaccinale de la population, laissant plus de place aux souches productrices de toxine diphtérique. Bien que la couverture vaccinale chez les enfants s'améliore au Vanuatu, la population actuellement adulte a été peu vaccinée. En effet, en 1982, seuls 22 % des enfants de 12 à 23 mois avaient été vaccinés contre la diphtérie.

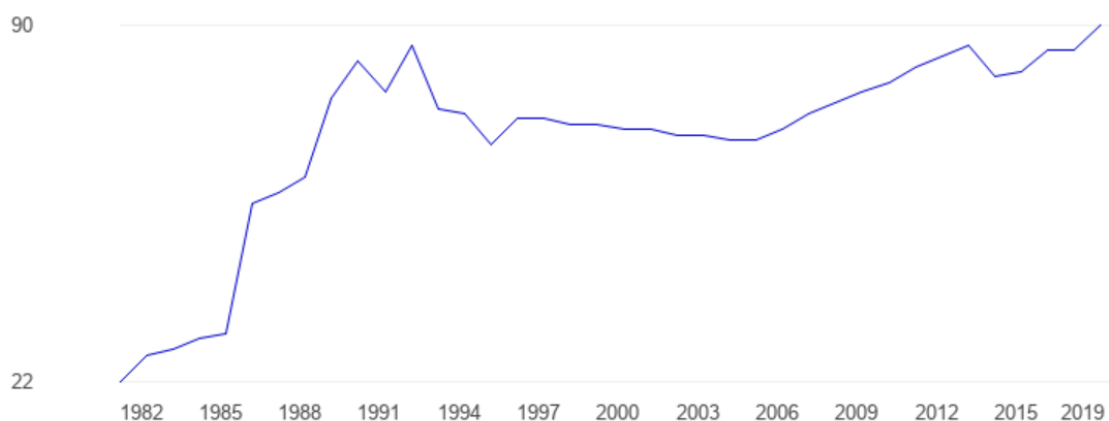


Figure 41 : Pourcentage des enfants de 12 à 23 mois vaccinés contre la diphtérie au Vanuatu de 1982 à 2019 (72).

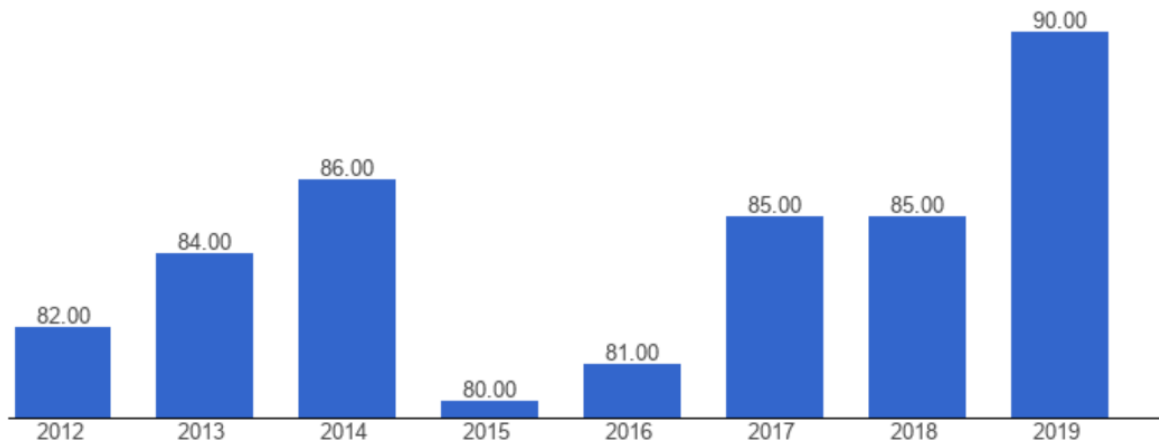


Figure 42 : Pourcentage des enfants de 12 à 23 mois vaccinés contre la diphtérie au Vanuatu de 2012 à 2019 (72).

Bien que les sujets ayant été détectés porteur de la diphtérie *tox+* en Nouvelle-Calédonie aient été correctement vaccinés, cette vaccination n'a pas suffi à les protéger contre les formes cutanées, possiblement parce que la réponse immunitaire médiée par les anticorps est peu effective au niveau cutané. Il n'a pas été observé de complication systémique liée à l'action de la toxine chez ces patients, mais l'effectif de patients porteur de touches *tox+* est trop faible pour pouvoir en tirer une conclusion.

Le vaccin étant composé d'une anatoxine purifiée, il ne protège que contre les souches productrices d'une toxine (et en particulier contre l'action de cette toxine) et non contre toutes les souches de diphtérie. Les souches *tox-* portées de manière asymptomatique constituent donc un réservoir de choix pour le phage β et si une souche *tox+* venait à diffuser en Nouvelle-Calédonie, on peut craindre que le phage β se répande d'autant mieux qu'une partie de la population porte déjà des souches *tox-*.

5. Conclusion

Cette étude a permis de faire le point sur les présentations cliniques et les caractéristiques des souches de *Corynebacterium diphtheriae* isolées en Nouvelle-Calédonie. En ce qui concerne la clinique, peu d'informations ont pu être relevées malgré un important travail de collecte. Il en ressort tout de même une grande majorité de présentations cutanées (84 % des cas), avec 94 % de co-infection avec *S. aureus* ou *S. pyogenes* pour ces atteintes. D'autre part, six endocardites infectieuses à *C. diphtheriae* ont été diagnostiquées, ce qui est à mettre en relation avec une certaine prédisposition de la population, liée en particulier à une forte prévalence de RAA. La majorité de nos souches ne possédaient pas le gène de la toxine diphtérique, probablement grâce à la bonne couverture vaccinale du territoire. Globalement l'ensemble des souches étudiées présentent une bonne sensibilité aux antibiotiques couramment utilisés (amoxicilline et macrolides). Les deux épisodes regroupant un total de 6 cas de *C. diphtheriae tox+* étaient tous importés du Vanuatu, pays proche où la couverture vaccinale antidiphtérique est moindre. Enfin, l'étude phylogénétique des souches a permis de mettre en évidence une faible diversité génétique par rapport à ce qui est observé ailleurs dans le monde. En effet, deux sous-lignées seulement représentent 65 % des souches isolées. Il serait intéressant de poursuivre ce travail par des enquêtes de prévalence chez les sujets sains, en Nouvelle-Calédonie mais également au Vanuatu.

Au Vanuatu, à Port Vila, la mise en place d'une plateforme de biologie moléculaire en collaboration avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie est en cours. Elle a pour objectif de participer à la formation universitaire, de servir au développement de projets, dont l'investigation de cas de *C. diphtheriae*. Cela sera d'une grande aide et permettra au Vanuatu de pouvoir lutter contre ce problème de manière plus efficace. En effet, nous avons vu qu'en Nouvelle-Calédonie, la mise en place de la détection du gène *tox* en local a permis d'accélérer considérablement les délais d'obtention de résultat et ainsi d'optimiser les enquêtes épidémiologiques autour de chaque cas détecté. Ainsi, dans les rares cas où le résultat revient positif, la connaissance de ce statut toxinique permet de mettre en place rapidement les mesures d'isolement nécessaires (arrêt de travail et de scolarité, hospitalisation si besoin, dépistages intensifs autour des cas) afin d'éviter la propagation de ce germe.

Bibliographie

1. Un peu d'histoire [Internet]. Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie. 2016 [cité 9 mai 2019]. Disponible sur: <https://gouv.nc/gouvernement-et-institutions/un-peu-d-histoire>
2. Nouvelle-Calédonie : résultats du référendum du 4 octobre 2020 | Vie publique.fr [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.vie-publique.fr/en-bref/274808-nouvelle-caledonie-resultats-du-referendum-du-4-octobre-2020>
3. Nouvelle-Calédonie - Géographie [Internet]. Service d'Information du Gouvernement. 2016 [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: <http://outre-mer.gouv.fr/nouvelle-caledonie-geographie>
4. Tous les diaporamas | Outre-Mer [Internet]. [cité 12 oct 2021]. Disponible sur: <http://outremer.mnhn.fr/diaporamas/oceans/pacifique>
5. projet de loi organique portant actualisation de la loi n° 99-209 du 19 mars 1999 relative à la Nouvelle-Calédonie (étude d'impact) [Internet]. [cité 12 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.senat.fr/leg/etudes-impact/pjl12-719-ei/pjl12-719-ei.html>
6. Populations légales des provinces de Nouvelle-Calédonie en 2019 – Populations légales de Nouvelle-Calédonie en 2019 | Insee [Internet]. [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/4464927?sommaire=2122859>
7. ISEE - Structure de la population et évolutions [Internet]. [cité 9 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.isee.nc/population/recensement/structure-de-la-population-et-evolutions>
8. ISEE - Communautés [Internet]. [cité 11 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.isee.nc/population/recensement/communautes>
9. La croissance démographique fléchit nettement en Nouvelle-Calédonie entre 2014 et 2019 - Insee Première - 1823 [Internet]. [cité 11 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/4924021>
10. L'organisation sanitaire de la Nouvelle-Calédonie | Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie [Internet]. [cité 28 sept 2021]. Disponible sur: <https://dass.gouv.nc/etablissements-et-professionnels/lorganisation-sanitaire-de-la-nouvelle-caledonie>
11. Pappas G, Kiriaze IJ, Falagas ME. Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. *Int J Infect Dis.* 1 juill 2008;12(4):347-50.
12. PubMed Central Full Text PDF [Internet]. [cité 24 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3078608/pdf/JRSM-10-K069-JL.pdf>
13. Elek SD. Recognition of Toxicogenic Bacterial Strains in Vitro. *Br Med J.* 13 mars 1948;1(4549):493-6.
14. Cerdeño-Tárraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MTG, Pallen M, Bentley SD, et al. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.* 15 nov 2003;31(22):6516-23.

15. Barksdale L. *Corynebacterium diphtheriae* and Its Relatives. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1 déc 1970;34(4):378-422.
16. Murphy JR. *Corynebacterium Diphtheriae*. In: Baron S, éditeur. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th éd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7971/>
17. Chassaing A. Mécanisme de translocation de la toxine diphtérique. :250.
18. Truelove SA, Keegan LT, Moss WJ, Chaisson LH, Macher E, Azman AS, et al. Clinical and Epidemiological Aspects of Diphtheria: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 juill 2020;71(1):89-97.
19. WHO | Diphtheria [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 23 avr 2021]. Disponible sur: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/diphtheria/en/
20. WHO World Health Organization: Immunization, Vaccines And Biologicals. Vaccine preventable diseases Vaccines monitoring system 2020 Global Summary Reference Time Series: DIPHTHERIA [Internet]. [cité 16 juill 2021]. Disponible sur: https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidediphtheria.html
21. May MLA, McDougall RJ, Robson JM. *Corynebacterium diphtheriae* and the returned tropical traveler. *J Travel Med.* févr 2014;21(1):39-44.
22. Dazas M, Badell E, Carmi-Leroy A, Criscuolo A, Brisse S. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* déc 2018;68(12):3826-31.
23. Badell E, Hennart M, Rodrigues C, Passet V, Dazas M, Panunzi L, et al. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. *Res Microbiol.* juin 2020;171(3-4):122-7.
24. Dangel A, Berger A, Rau J, Eisenberg T, Kämpfer P, Margos G, et al. *Corynebacterium silvaticum* sp. nov., a unique group of NTTB corynebacteria in wild boar and roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70(6):3614-24.
25. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinslerling VA, Yakovlev AA. The Pathology of Diphtheria. :5.
26. Sharma NC, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat Rev Dis Primer.* 5 déc 2019;5(1):1-18.
27. Avis HCSP Full Text PDF [Internet]. [cité 3 mars 2021]. Disponible sur: https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspr20110304_conduitediphtherie.pdf
28. Alekseev VI, Kaboev OK, Semenova EV, Shcherbakova OG, Filatov MV. [Immunological similarity of diphtheria toxin and EGF receptor]. *Tsitologiya.* 2010;52(5):364-70.
29. Belko J, Wessel DL, Malley R. Endocarditis caused by *Corynebacterium diphtheriae*: case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J.* févr 2000;19(2):159-63.

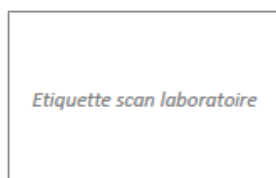
30. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, Edwards B, Blom J, Hoskisson PA. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing. *Infect Genet Evol.* janv 2014;21:54-7.
31. Funke G, Graevenitz AV, Iii JEC, Bernard KA. *Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria.* CLIN MICROBIOL REV. 1997;10:35.
32. DM Lab 17 [Internet]. [cité 7 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.medschool.lsuhsu.edu/microbiology/DMIP/dmex17.htm>
33. API-Coryne.pdf [Internet]. [cité 3 mars 2021]. Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/wp-content/uploads/2019/02/API-Coryne.pdf>
34. VITEK® 2 ANC - Carte d'identification des bactéries anaérobies et corynéformes médicalement pertinentes [Internet]. bioMérieux France. [cité 3 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/vitek2-anc-carte-d-identification-des-bacteries-anaerobies-et-coryneformes>
35. von Hunolstein C. Penicillin tolerance amongst non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from cases of pharyngitis. *J Antimicrob Chemother.* 1 juill 2002;50(1):125-8.
36. Bernard K, Pacheco AL. In Vitro Activity of 22 Antimicrobial Agents against *Corynebacterium* and *Microbacterium* Species Referred to the Canadian National Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Newsl.* 1 déc 2015;37(23):187-98.
37. Zou J, Chorlton SD, Romney MG, Payne M, Lawson T, Wong A, et al. Phenotypic and Genotypic Correlates of Penicillin Susceptibility in Nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*, British Columbia, Canada, 2015–2018. *Emerg Infect Dis.* janv 2020;26(1):97-103.
38. Serwold-Davis TM, Groman NB. Mapping and cloning of *Corynebacterium diphtheriae* plasmid pNG2 and characterization of its relatedness to plasmids from skin coryneforms. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1986;30(1):69-72.
39. Tauch A, Bischoff N, Brune I, Kalinowski J. Insights into the genetic organization of the *Corynebacterium diphtheriae* erythromycin resistance plasmid pNG2 deduced from its complete nucleotide sequence. *Plasmid.* janv 2003;49(1):63-74.
40. Ortiz-Pérez A, Martín-de-Hijas NZ, Esteban J, Fernández-Natal MI, García-Cía JI, Fernández-Roblas R. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb Drug Resist Larchmt N.* déc 2010;16(4):273-7.
41. Antibiotic Resistance and Detection of the Most Common Mechanism of Resistance (MLSB) of Opportunistic *Corynebacterium* - FullText - Chemotherapy 2013, Vol. 59, No. 4 - Karger Publishers [Internet]. [cité 17 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.karger.com/Article/FullText/357467>
42. Rockhill RC, Sumarmo null, Hadiputranto H, Siregar SP, Muslihun B. Tetracycline resistance of *Corynebacterium diphtheriae* isolated from diphtheria patients in Jakarta, Indonesia. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1982;21(5):842-3.
43. Pereira GA, Pimenta FP, Santos FRW dos, Damasco PV, Hirata Júnior R, Mattos-Guaraldi AL. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* août 2008;103:507-10.

44. Gruner E, Opravil M, Altwegg M, von Graevenitz A. Nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from intravenous drug users. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* janv 1994;18(1):94-6.
45. Hennart M, Panunzi LG, Rodrigues C, Gaday Q, Baines SL, Barros-Pinkelnic M, et al. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. *Genome Med.* 27 nov 2020;12(1):107.
46. Tauch A, Götter S, Pühler A, Kalinowski J, Thierbach G. The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid.* sept 2002;48(2):117-29.
47. Tauch A, Pühler A, Kalinowski J, Thierbach G. TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems. *Plasmid.* nov 2000;44(3):285-91.
48. Warburton PJ, Amodeo N, Roberts AP. Mosaic tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *J Antimicrob Chemother.* déc 2016;71(12):3333-9.
49. Courvalin P. AntibioGramme. In: *AntibioGramme*. 2ème édition. p. 371-9.
50. Abbott DW, Higgins MA, Hyrnuik S, Pluvineau B, Lammerts van Bueren A, Boraston AB. The molecular basis of glycogen breakdown and transport in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1 juill 2010;77(1):183-99.
51. Santos AS, Ramos RT, Silva A, Hirata R, Mattos-Guaraldi AL, Meyer R, et al. Searching whole genome sequences for biochemical identification features of emerging and reemerging pathogenic *Corynebacterium* species. *Funct Integr Genomics.* sept 2018;18(5):593-610.
52. Guglielmini J, Hennart M, Badell E, Toubiana J, Criscuolo A, Brisse S. Genomic epidemiology and strain taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Clin Microbiol.* 15 sept 2021;JCM0158121.
53. Diphtérie - [Internet]. microbiologiemedicale.fr. [cité 6 oct 2021]. Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/diphtherie/>
54. Falnes PØ, Ariansen S, Sandvig K, Olsnes S. Requirement for Prolonged Action in the Cytosol for Optimal Protein Synthesis Inhibition by Diphtheria Toxin *. *J Biol Chem.* 11 févr 2000;275(6):4363-8.
55. Trost E, Al-Dilaimi A, Papavasiliou P, Schneider J, Viehoveer P, Burkovski A, et al. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC Genomics.* 30 juill 2011;12:383.
56. Nair RR, Joseph TP. Nasotracheal intubation in diphtheria. *J Pediatr Surg.* avr 1975;10(2):201-2.
57. ATUN - ANTITOXINE DIPHTERIQUE (équine), solution injectable - ANSM [Internet]. [cité 1 oct 2021]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/tableau-atun/antitoxine-diphtherique-equine-solution-injectable>
58. DGS_Anne.M, DICOM_Jocelyne.M, DGS_Anne.M, DICOM_Jocelyne.M. Le calendrier des vaccinations [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2021 [cité 3 mars 2021].

Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/prevention-en-sante/preserver-sa-sante/vaccination/calendrier-vaccinal>

59. Liste des maladies à déclaration obligatoire [Internet]. [cité 2 mars 2021]. Disponible sur: [/maladies-a-declaration-obligatoire/liste-des-maladies-a-declaration-obligatoire](#)
60. HCSP. Conduite à tenir lors de l'apparition d'un cas de diphtérie [Internet]. Rapport de l'HCSP. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2011 mars [cité 3 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=215>
61. Maladie à déclaration obligatoire - Diphtérie (Formulaire 12198*03) [Internet]. [cité 7 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.service-public.fr/professionnels-entreprises/vosdroits/R17762>
62. Elek SD. The Plate Virulence Test for Diphtheria. *J Clin Pathol.* nov 1949;2(4):250-8.
63. Seastone CV. Modified Elek Plate. *J Bacteriol.* mars 1965;89(3):928.
64. Engler KH, Glushkevich T, Mazurova IK, George RC, Efstratiou A. A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol.* févr 1997;35(2):495-8.
65. Schuegger R, Linder Mayer M, Kugler R, Heesemann J, Busch U, Sing A. Detection of Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* Strains by a Novel Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* août 2008;46(8):2822-3.
66. Zasada AA, Baczewska-Rej M, Wardak S. An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland — molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. *Int J Infect Dis.* 1 oct 2010;14(10):e907-12.
67. Melot B, Colot J, Lacassin F, Tardieu S, Lapisardi E, Mayo M, et al. Melioidosis in New Caledonia: a dominant strain in a transmission hotspot. *Epidemiol Infect.* avr 2016;144(6):1330-7.
68. Chatard J-C, Dubois T, Espinosa F, Kamblock J, Ledos P-H, Tarpinian E, et al. Screening Rheumatic Heart Disease in 1530 New Caledonian Adolescents. *J Am Heart Assoc.* 5 mai 2020;9(9):e015017.
69. Ledos P-H, Kamblock J, Bourgoin P, Eono P, Carapetis JR. Prevalence of rheumatic heart disease in young adults from New Caledonia. *Arch Cardiovasc Dis.* janv 2015;108(1):16-22.
70. Mirabel M, Fauchier T, Bacquelin R, Tafflet M, Germain A, Robillard C, et al. Echocardiography screening to detect rheumatic heart disease: A cohort study of schoolchildren in French Pacific Islands. *Int J Cardiol.* 1 juin 2015;188:89-95.
71. Mirabel M, André R, Barsoum P, Colboc H, Lacassin F, Noel B, et al. Ethnic disparities in the incidence of infective endocarditis in the Pacific. *Int J Cardiol.* 2015;186:43-4.
72. Vanuatu DPT immunization rate - data, chart [Internet]. TheGlobalEconomy.com. [cité 27 sept 2021]. Disponible sur: https://www.theglobaleconomy.com/Vanuatu/dpt_immunization_rate/

Annexe 1 : Bon de transmission des souches



Bon de prescription d'examens de biologie médicale

Unité de Microbiologie

BACTERIOLOGIE - PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE

Chef de service : Dr E. CHOBLET

Responsable d'UF : Dr AC. GOURINAT

Biologistes : Dr AC. GOURINAT (20.89.17), Dr A. BIRON (20.89.16), Dr J. COLOT (20.89.30)



Patient	Prescripteur	Cadre réservé au laboratoire
Nom de naissance :	Laboratoire expéditeur :	Date de réception : / /
Prénom(s) :		Heure de réception :
Nom d'usage :		
Date de naissance : / /	Tél :	
Sexe : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M Tél :	Date : / /	
Adresse :		

Bon de transmission de souches bactériennes réseaux de surveillance NC

Réseau Antibiorésistance (RESATB)

Souche transmise pour détermination du mécanisme de résistance (BHRe ou mécanisme de résistance inhabituel)
Merci de transmettre les résultats de votre antibiogramme

Type de prélèvement :

Réseau Diphtérie (RESDIP)

Souche de *Corynebacterium diphtheriae* pour antibiogramme et recherche de la toxine diphtérique

Type de prélèvement :

Réseau Gonocoque (RESGO)

Souche transmise pour réalisation de l'antibiogramme (suivi de l'évolution des résistances en NC)

Type de prélèvement : vaginal urétral autres :

Notion de voyage au cours des 2 derniers mois : oui non ne sais pas / Si oui, où ?

Réseau Pneumocoque (RESPNO)

Souche transmise pour sérogroupage et réalisation de l'antibiogramme (suivi de l'évolution des résistances en NC)
Merci de ne transmettre uniquement que les souches invasives

Type de prélèvement : LCR hémoculture liquide pleural pus d'oreille

Réseau Salmonelle (RESSAL)

Souche transmise pour sérotypage et réalisation de l'antibiogramme (suivi de l'évolution des résistances en NC)

Type de prélèvement : selles urines hémocultures autres :

Centre national de référence des corynébactéries du complexe *diphtheriae*

Questionnaire clinique

Hôpital d'origine: _____ Service d'hospitalisation: _____

Clinicien référent : _____

INFORMATIONS GENERALES PATIENT :

Nom abrégé : _____

CODE : _____

Date de naissance (jj-mm-année) : _____

Sexe : Masculin Féminin

Lieu de résidence : _____

Pays d'origine : _____

Patient vacciné DTP : oui non inconnu si oui, combien de doses _____

Date de la dernière vaccination diphtérie : _____ nom commercial du vaccin _____

Satu vaccinal inconnu

Vivant Décédé

Si décédé, date _____ et cause _____

Lieu de vie :

Campagne ville

Vie en famille oui non si oui, combien de personnes _____

Métier : _____

En contact régulier avec animaux oui non si oui, lesquels _____

Consommation de produits de la ferme (produits non pasteurisés ect..) : _____

Notion de contagie infectieux : oui non si oui, quel contact _____,
type d'infection _____ et date du contagie _____

ANTECEDENTS DU PATIENT

- Aucun

- Episodes infectieux antérieurs: oui non si oui, le(s)quelle(s) _____

- Immunodépression: oui non si oui, laquelle _____

- Insuffisance respiratoire chronique : oui non si oui, laquelle _____

- Cardiopathie : oui non si oui, laquelle _____

- Insuffisance rénale : oui non

- Diabète : oui non

- Autres : oui non si oui, lesquels _____

CAS DE DIPHTERIE

Date des premiers symptômes :/...../.....

Date de la première prise en charge médicale :/...../.....

Hospitalisation : oui non Si oui, date d'hospitalisation :/...../.....

1. ATTEINTE CUTANEE :Oui Non Si oui, présence de membranes : Oui Non

Apparition des lésions le/...../.....

Si oui, présence de nécrose : Oui Non

Localisation	Caractéristiques			Documentation microbiologique		
Ulcère	Ulcère	oui	non	oui	non	Type de prélèvement :
	Nombre :					
	Taille (cm) :	Lésion n°1 : Lésion n°2 :				
	Localisation :	Lésion n°1 : Lésion n°2 :				
	Réponse au traitement	oui	non	Commentaires :		
Erythème	Erythème	oui	non	oui	non	Type de prélèvement :
	Nombre :					
	Taille (cm)	Lésion n°1 : Lésion n°2 :				
	Localisation	Lésion n°1 : Lésion n°2 :				
	Réponse au traitement	oui	non	Commentaires :		
Absès	Absès	oui	non	oui	non	Type de prélèvement :
	Nombre :					
	Taille (cm)	Lésion n°1 : Lésion n°2 :				
	Localisation	Lésion n°1 : Lésion n°2 :				
	Response au traitement	oui	non	Commentaires:		

2. ATTEINTE RESPIRATOIRE :

Oui Non Si oui, apparition des symptômes le/...../.....

Dysphonie Oui Non présence de membranes : Oui Non

Adénopathies cervicales Oui Non présence de nécrose : Oui Non

Localisation respiratoire haute	Caractéristiques		Documentation bactériologique		
			oui	non	Type de prélèvement
Sinus	Sinus				Type de prélèvement
	Localisation :				
	Aspect macroscopique :				
	Réponse au traitement		oui	non	Commentaire :
Pharynx	Pharynx				Type de prélèvement
	Localisation :				
	Aspect macroscopique:				
	Réponse au traitement		oui	non	Commentaire :
Autres	Autre localisation				Type de prélèvement
	Localisation :				
	Aspect macroscopique :				
	Réponse au traitement		oui	non	Commentaire :

Localisation respiratoire basse	Caractéristiques			Documentation bactériologique		
				oui	non	Type de prélèvement:
Larynx	Larynx	oui	non	oui	non	Type de prélèvement:
	Localisation :					
	Aspect macroscopique :					
	Response au traitement		oui	non	Commentaires:	
Poumon	Poumon	oui	non	oui	non	Type de prélèvement:
	Localisation :					
	Aspect macroscopique :					
	Response au traitement		oui	non	Commentaires:	

Défaillance respiratoire	Défaillance respiratoire	oui	non	Commentaires:
	Dyspnée inspiratoire	oui	non	
	Dyspnée expiratoire	oui	non	
	Type de traitement : - Oxygénothérapie - Ventilation non invasive - Intubation - Autre	oui oui oui oui	non non non non	
	Réponse au traitement	oui	non	Commentaire:

3. ATTEINTE MULTIVISCERALE

Oui Non Si oui, apparition des symptômes le/...../.....

Localisation	Caractéristiques	Documentation bactériologique		
Coeur	Cœur / valves Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	oui	non	Type de prélèvement :
	Localisation :			
	Aspect macroscopique :			
	Réponse au traitement	oui	non	Commentaire :
Appareil digestif	Appareil digestif Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	oui	non	Type de prélèvement :
	Localisation :			
	Aspect macroscopique:			
	Réponse au traitement	oui	non	Commentaire :
Système nerveux central	SNC Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	oui	non	Type de prélèvement :
	Localisation :			
	Aspect macroscopique :			
	Réponse au traitement	oui	non	Commentaire :
Os	Ostéoarticulaire Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	oui	non	Type de prélèvement :
	Localisation :			
	Aspect macroscopique :			
	Réponse au traitement	oui	non	Commentaire :
Autre localisation	Autre Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>	oui	non	Type de prélèvement :
	Localisation :			
	Aspect macroscopique :			
	Réponse au traitement	oui	non	Commentaire :

4. TRAITEMENTIsolement respiratoire : Oui Non Date début de l'isolement _____Assistance d'organe : Oui Non : Type _____ Assistance du .../.../... au .../.../...Antibiothérapie: Oui Non Date début de l'antibiothérapie .../.../...

Antibiotique 1	nom de l'antibiotique :	per os	IV	Dose : mg/jour Nombre de prises/j :
	Nombre de jours de traitement :			
	Sensibilité à l'antibiogramme :			
	Réponse au traitement :	oui	non	Commentaire :
Antibiotique 2	nom de l'antibiotique :	per os	IV	Dose : mg/jour Nombre de prises/j :
	Nombre de jours de traitement :			
	Sensibilité à l'antibiogramme :			
	Réponse au traitement :	oui	non	Commentaire :
Antibiotique 3	nom de l'antibiotique :	Per os	IV	Dose : mg/jour Nombre de prises/j :
	Nombre de jours de traitement :			
	Sensibilité à l'antibiogramme :			
	Réponse au traitement :	oui	non	Commentaire :
Sérothérapie	nom du produit :	IM	Autre voie :	Dose : mg/jour Délai par rapport au début des symptômes : jours
	Réponse au traitement :	oui	non	Commentaire :
Vaccination	nom du vaccin :	IM	Sous cutané	Délai par rapport au début des symptômes : jours
	Effet secondaire :	oui	non	Commentaire :
Autres traitements par voie générale	produit 1:	Per os	IV	Dose : mg/jour Nombre de prises/j :
	Nombre de jours de traitement :			
	Réponse au traitement :	oui	non	Commentaire :
	produit 2:	Per os	IV	Dose : mg/jour Nombre de prises/j :
	Nombre de jours de traitement :			
Réponse au traitement :	oui	non	Commentaire :	
Soins locaux	Type de soin :	Localisation du soin :		Nombre de soins/jour :
	Nombre de jours de traitement :			
	Réponse au traitement :	oui	non	Commentaire :

5. EXAMENS COMPLEMENTAIRES

Numération formule sanguine		
	Date #1 :	Date #2:
Hémoglobine (g/dL)		
Polynucléaires neutrophiles (/mm ³)		
Lymphocytes (/mm ³)		
Plaquettes (/mm ³)		
Paramètres inflammatoires		
CRP (mg/mL)		
Procalcitonine (ng/mL)		
VS		
Autre		
Fonction rénale et hépatique		
Urée / Créatinine (mmol/L)	/	/
ASAT /ALAT (UI/L)	/	/
GGT/PAL (UI/L)	/	/
Sérologies vaccinales		
Anticorps anti-diphtérie	/	/
Anticorps anti(tétanos	/	/

Autres résultats biologiques

Résultats d'imagerie	Interprétation :	
	Date #1 :	Date #2:
Radiographie de thorax		
Autre imagerie :		

6. SUJETS CONTACTS (animaux et humains)

En cas de corynébactérie tox+, des contacts ont-ils été prélevés? oui non inconnu

Si oui, Combien de contacts ont été prélevés _____

Contact familial , contact animal , professionnel , autre _____

Prélèvement envoyé au CNR ? oui non

Code du prélèvement réalisé _____

Résultat : _____ inconnu



 Laboratoire de Biologie Médicale

Grille de saisie ATB : Corynebactéries

Ref : ENR-A3-021-03
 Version : 05
 Applicable le : 17-06-2019



Valeurs critiques valables également pour *Arcanobacterium* spp. *Arthrobacter* spp. *Brevibacterium* spp. *Microbacterium* spp. *Cellulomonas* spp. *Rothia* spp. *Turicella* spp. *Dermabacter* spp.

Boîte faite le (date + heure) : Boîte lue le (date + heure) :

Germe : Dossier :

2 Gélules MH-F / 0,5 McF / écouvillonnage / 5% CO₂, 35±2°C, 20±4H / Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Boîte N°	Famille	Code	µg	Liste standard	S ≥	R <
1	Pénicilline	AMP	E-test	Ampicilline	≤2	>8
		PNG	E-test	Pénicilline G	≤0.125	>0.125
		PNG	1 unité	Pénicilline G	29	29
	Aminoside	GMN	10	Gentamicine	23	23
		VNC	5	Vancomycine	17	17
	Glycopeptide	CIP	5	Ciprofloxacine	25	25
		CMN	2	Clindamycine	20	20
	Divers	SXT	1,25-23,75	Cotrimoxazole	19	16
		TET	30	Tétracycline	24	24
		RIF	5	Rifampicine	30	25

ATTENTION : solution à 0,5 McF diluée au 10^{ems} (Recommandations 2013)

Boîte n°	Famille	Code	µg	Liste standard	S ≥	R <
2	MLS	ERY	15	Erythromycine	22	17
		AZM	15	Azithromycine	22	17
	Pénicilline	PNG	10 unités	Pénicilline G	29	18

Source : Corynebactéries CASFMT 2019 p.97 / CA-SFM 2013 p.9-12]

Titre : Épidémiologie de la diphtérie en Nouvelle-Calédonie

Résumé :

Introduction : Le nombre croissant d'isolement de *Corynebacterium diphtheriae* relevé en Nouvelle-Calédonie, la potentielle gravité de cette infection et la répercussion en termes d'actions de santé publique à mettre en place nous ont incités à nous intéresser plus particulièrement à cette espèce bactérienne et à son épidémiologie locale. **Matériel et méthode :** Une étude clinique rétrospective a été réalisée par consultation des dossiers patients pour chacun des 84 épisodes inclus. Parmi ces cas, 58 ont été conservés, pour lesquelles les antibiogrammes ont été retestés, le gène *tox* recherché, le biovar déterminé, les souches séquencées et un arbre phylogénétique a été réalisé en se basant sur le *core* génome de notre cohorte. **Résultats :** Nous notons une concentration des cas en particulier autour de Nouméa et Lifou. 84 % des prélèvements ont été réalisés au niveau cutané. Les souches présentes sur le territoire sont globalement sensibles à la majorité des antibiotiques couramment utilisés. On note cependant 27,9 % de souches résistantes à la tétracycline. 63,7 % de nos souches appartiennent à seulement deux sous-lignées, peu retrouvés ailleurs dans le monde. Les souches dans leur grande majorité n'expriment pas la toxine diphtérique, excepté deux épisodes, de 1 cas et 5 cas, tous importés du Vanuatu. **Discussion :** L'évolution des référentiels utilisés pour la réalisation des antibiogrammes tend à rendre les souches plus souvent résistantes sans réalité biologique lorsque l'on applique la même technique à toutes les souches. Des portages asymptomatiques et découvertes fortuites font penser qu'il y a un nombre important de souches *tox*- en Nouvelle-Calédonie, réservoir potentiel en cas d'introduction de souches *tox*+ via le Vanuatu par exemple. Cela doit susciter une attention particulière en ce qui concerne la couverture vaccinale de la population.

Mots clés : *Corynebacterium diphtheriae*, Nouvelle-Calédonie, Toxine diphtérique, Épidémiologie, Génomique,

Title: Epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* in New-Caledonia

Abstract:

Introduction: The increasing number of cases of isolation of *Corynebacterium diphtheriae* in New Caledonia, the potential severity of this infection and the consequences in terms of public health actions have prompted us to focus on this bacterial species and its local epidemiology. **Material and method:** A retrospective clinical study was conducted by consulting patient records for each of the 84 cases included. Among these cases, 58 were retained, for which the antibiograms were retested, the *tox* gene sought, the biovar determined, the strains sequenced and a phylogenetic tree carried out based on the core genome of our cohort. **Results:** We note a concentration of cases particularly around Nouméa and Lifou. 84% of samples were taken at skin level. Overall the strains present in the territory are sensitive to the majority of commonly used antibiotics. However, 27.9% of tetracycline-resistant strains were found. 63.7% of our strains belong to only two sublineages, few found elsewhere in the world. The vast majority of strains do not express diphtheria toxin, except for two episodes, one case and five cases, all imported from Vanuatu. **Discussion:** The evolution of the repositories used for the realization of antibiograms tends to make strains more often resistant without biological reality when the same technique is applied to all strains. Asymptomatic portages and incidental discoveries suggest that there is a significant number of *tox* - strains in New Caledonia, a potential reservoir in case of introduction of *tox*+ strains via Vanuatu for example. This should motivate particular attention to population immunization coverage.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, New Caledonia, Diphtheria toxin, Epidemiology, Genomic

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Bactériologie du CHT
110 Boulevard Joseph Wamytan,
98835 Dumbéa Sur Mer.