



**Centre National de Référence  
des Mycobactéries et  
de la Résistance des Mycobactéries  
aux Antituberculeux (CNR-MyRMA)**

**Laboratoire coordinateur**

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène  
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière  
Responsable : Pr Vincent JARLIER

**Laboratoire associé**

Laboratoire de Bactériologie- Hygiène  
Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal  
Responsable : Pr Emmanuelle CAMBAU

---

**Rapport d'activité pour l'année 2012**

**Avril 2013**

---

# Table des matières

FICHE D'IDENTITÉ DU LABORATOIRE COORDONNATEUR ET DU LABORATOIRE ASSOCIÉ DU CNR-MYRMA.....	1
1. MISSIONS ET CAPACITÉS DU CNR.....	2
2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE.....	10
2.1. Capacités techniques du CNR .....	10
2.2. Activités d'expertise assurées par le CNR pour les laboratoires français en 2012 .....	17
3. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE.....	38
3.1. Activités de surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux anti-tuberculeux	38
3.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens, de la tuberculose....	50
3.3. Etude génotypique des souches de <i>M.tuberculosis</i> : détection et investigation des cas groupés.....	51
4. ALERTES .....	58
4.1. Alertes et enquêtes 2012 sur des cas de tuberculose .....	58
4.2. Alertes et enquêtes 2012 sur des cas d'infection à mycobactérie atypique .....	58
5. ACTIVITÉS D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL .....	59
5.1. Information.....	59
5.2. Formation .....	59
5.3. Activités de conseil .....	60
6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR-MYRMA .....	63
6.1. Chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries .....	63
6.2. Synthèse de nouvelles fluoroquinolones et évaluation de leur activité in vitro sur l'ADN gyrase de <i>M. leprae</i> et de <i>M. tuberculosis</i> .....	65
6.3. Mécanismes de résistance chez les mycobactéries .....	66
6.4. Etude génotypique des mycobactéries.....	67
7. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2012 .....	71
7.1. Publications nationales .....	71
7.2. Publications internationales.....	71
7.3. Chapitres d'ouvrages.....	72
7.4. Communications nationales.....	73
7.5. Communications internationales .....	73
7.6. Conférences sur invitations nationales .....	74
7.7. Conférences sur invitations internationales.....	75
8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ 2013 - 2014 .....	76
8.1. Développer et évaluer les nouvelles techniques de diagnostic de la maladie et de l'infection tuberculeuse ainsi que le diagnostic des infections à mycobactéries atypiques et à mycobactéries dites rares.....	76
8.2. Activités de Surveillance.....	78
8.3. Activités d'information, formation, conseils .....	79
8.4. Travaux de recherche en lien avec l'activité du CNR .....	79



## Fiche d'identité du laboratoire coordonnateur et du laboratoire associé du CNR-MyRMA

- **Laboratoire coordonnateur**

- Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière-Charles Foix (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris)

47-83 Boulevard de l'hôpital

75634 PARIS cedex 13

Téléphone : +33 (0) 1 42 16 20 70 secrétariat, +33 (0) 1 42 16 20 83 bureau CNR-MyRMA

Fax : +33 (0) 1 42 16 20 72

Email : [cnr.myctb@psl.aphp.fr](mailto:cnr.myctb@psl.aphp.fr)

Site Internet : <http://cnrmyctb.free.fr>

- Responsable scientifique : Pr Vincent JARLIER

Téléphone : +33 (0) 1 42 16 20 70, +33 (0) 6 80 08 59 68

Email : [vincent.jarlier@psl.aphp.fr](mailto:vincent.jarlier@psl.aphp.fr)

- Responsable administratif : Mr Jacques LEGLISE, Directeur du groupe hospitalier, assisté de Mr Michel BUCHERT, gestion financière

- **Laboratoire associé**

- Laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), site Lariboisière

2, rue Ambroise Paré

75018 Paris cedex 18

Téléphone : +33 (0) 1 49 95 65 51 secrétariat, +33 (0) 1 49 95 65 54 bureau CNR-MyRMA

Fax : +33 (0) 1 49 95 85 37

- Responsable scientifique: Pr Emmanuelle CAMBAU

Téléphone : +33 (0) 1 49 95 65 54, +33 (0) 6 80 42 25 08

Email : [emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr](mailto:emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr)

- Responsable administratif : Mr Christian NICOLAS, Directeur adjoint du Groupe Hospitalier, assisté de Mme Marie Noëlle PHILIPPON, gestion financière



## 1. Missions et capacités du CNR

### Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR-MyRMA en termes de santé publique, son organisation, la répartition des missions avec le laboratoire associé et les principaux partenaires

#### Objectifs majeurs

En raison des difficultés techniques inhérentes aux mycobactéries, de la dispersion des diagnostics des cas de tuberculose et de mycobactériose dans de nombreux laboratoires et de la diminution progressive du nombre de cas de tuberculose, entraînant une diminution du niveau général d'expertise tant clinique que biologique, il est particulièrement important :

- de **maintenir un centre d'expertise** pour (a) le diagnostic, (b) l'identification des souches difficiles, (c) les tests de sensibilité aux antibiotiques, en particulier aux antibiotiques de seconde ligne, (d) l'identification des gènes de résistance, (e) le génotypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques),
- d'évaluer les **nouvelles techniques** et développer **des contrôles de qualité**,
- **de participer à la surveillance épidémiologique**, en particulier pour les formes rares de la tuberculose et la résistance aux antibiotiques antimycobactériens,
- de participer au dispositif **d'alerte**,
- d'assurer des **activités d'information et de formation**.

#### Répartition des missions et des tâches entre le laboratoire coordonnateur et le laboratoire associé

**L'association des 2 laboratoires augmente notablement les possibilités logistiques** (continuité du service...). Elle permet **une suppléance pour les analyses d'expertise courante** (mise en culture de prélèvements, identification de souches de mycobactérie, détection moléculaire de la résistance aux antituberculeux), qui peuvent être menées dans chacun des 2 laboratoires **et permet de mettre en commun des approches techniques complémentaires**.

**Le laboratoire coordonnateur**, (laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière à Paris, responsable Pr Vincent Jarlier) a la maîtrise des techniques mycobactériologiques classiques et génotypiques, une longue expérience des antituberculeux (tests de sensibilité, mécanismes de résistance, chimiothérapie expérimentale [modèles animaux], conseils thérapeutiques), et assure l'animation et la gestion de deux réseaux de laboratoires (réseau AZAY-mycobactéries et réseau CNR-MyRMA, cf. plus loin).

**Le laboratoire associé** (laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière, site Lariboisière à Paris, responsable Pr Emmanuelle Cambau) bénéficie d'une équipe de mycobactériologistes confirmés ayant des compétences complémentaires de celle de l'équipe du laboratoire coordonnateur concernant (a) les mycobactéries atypiques, en particulier pour ce qui est de leurs aspects iatrogènes, de la maîtrise des techniques de recherche dans l'environnement, du génotypage et de l'évaluation de l'activité in vitro de nouveaux antibiotiques ou associations d'antibiotiques, (b) la lèpre et (c) les tests immunologiques.



## Tâches et missions spécifiques du laboratoire coordonnateur et du laboratoire associé

(a) tuberculose et mycobactérioses respiratoires communautaires, aspects diagnostiques et thérapeutiques : laboratoire coordonnateur Pitié-Salpêtrière,

(b) mycobactérioses iatrogènes et liées aux soins, mycobactérioses cutanées (infections à *M. marinum*, ulcère de Buruli), lèpre, étude de l'activité des antibiotiques sur les mycobactéries atypiques et mécanismes de résistance des mycobactéries atypiques : laboratoire associé Saint Louis-Lariboisière.

Cette répartition permet d'optimiser l'expertise et l'efficacité des appuis aux microbiologistes et aux cliniciens et d'améliorer l'efficacité des interventions auprès des partenaires sanitaires lors d'alertes, avec un partenariat, d'une part, avec les CLAT et le département « tuberculose » de l'Institut de Veille Sanitaire, et d'autre part, avec les CCLIN et le département « infections nosocomiales » de l'Institut de Veille Sanitaire.

Le laboratoire coordonnateur dispose d'un vaste laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 qui lui permet de prendre en charge l'expertise concernant les cas de tuberculose en particulier pour les analyses nécessitant des subcultures de souches MDR et XDR. Le laboratoire associé est bien équipé pour les analyses de biologie moléculaire, la spectrométrie de masse et l'étude approfondie des mycobactéries atypiques. La mise au point et l'évaluation des nouvelles méthodes de laboratoires (cf. plus loin) suivront aussi cette dichotomie.

Le fait que les 2 laboratoires soient situés à Paris et appartiennent à la même institution (Assistance publique-Hôpitaux de Paris) facilite beaucoup la communication et les transports entre eux.

## Principaux partenaires

La surveillance de certaines infections à mycobactéries et de leur résistance aux antibiotiques est réalisée par le CNR-MyRMA à travers deux réseaux de partenaires, le réseau Azay-Mycobactéries et le réseau CNR-MyRMA.

### Le réseau Azay-Mycobactéries

La surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux est basée sur la collaboration volontaire de laboratoires hospitalo-universitaires de Bactériologie, particulièrement impliqués en mycobactériologie et organisés en réseau (Groupe "Azay Mycobactéries", animé jusqu'en 2010 par Jeanne Texier-Maugein – Bordeaux et depuis 2011 par Christian Martin - Limoges). Pour ses activités de surveillance de la résistance, le réseau est conjointement animé par le CNR-MyRMA.

La surveillance assurée à travers ce réseau est standardisée, en particulier pour ce qui est du recueil des informations cliniques et des résultats des épreuves de sensibilité aux antibiotiques de première ligne (isoniazide, rifampicine, streptomycine, éthambutol). Chaque laboratoire a comme responsabilité de recueillir pour chaque cas de tuberculose bactériologiquement confirmé (culture positive) les données suivantes, conformément aux recommandations l'OMS : âge, pays de naissance, co-infection par le VIH, localisation clinique de la tuberculose et antécédent de traitement antituberculeux.

Les données sont recueillies d'une manière continue depuis 1995 et transmises anonymement au CNR-MyRMA où elles sont validées puis analysées.

Le nombre de CHU participant au réseau Azay-Mycobactéries a doublé depuis 1995 : 15 en 1995, 23 en 2001, 27 en 2002, 33 en 2004 et 32 en 2006 et 35 en 2008. Le réseau couvre maintenant toutes les régions métropolitaines françaises sauf la Corse qui n'a pas de CHU. Le nombre total de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les laboratoires du réseau est de **l'ordre de 1500** par an, soit **près d'un tiers du total des cas de tuberculose à culture positive identifiés en France**.

La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis qui ont montré que la sensibilité du réseau est convenable (>95%), que la concordance des données avec celles de la DO et celles des dossiers médicaux des cas est aussi convenable et, que les discordances observées ont un impact très faible sur les taux de résistance stratifiés par facteur de risque (antécédents de traitement, pays de naissance). Après corrections tenant compte de ces discordances, les taux corrigés sont très proches des taux observés par le réseau. Les résultats de ces travaux méthodologiques ont été publiés (Guérin-Tran, Eur J Epidemiol 2006 ; Khuê, Epidemiol Infect 2008).



## Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, avec l'aide d'environ 300 laboratoires correspondants (Réseau CNR-MyRMA), la surveillance annuelle du nombre de malades ayant une tuberculose bactériologiquement confirmée (culture positive) et, parmi ces malades, du nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine (cas de tuberculose à bacilles multirésistants ou MDR). Ce réseau est aussi mis à contribution pour surveiller de manière intermittente certaines formes particulières de tuberculose (méningites, *M. bovis*...).

Le rôle joué par le CNR-MyRMA dans la vie des deux réseaux ci-dessus est essentiel en matière d'organisation et de service rendu aux microbiologistes en échange de leur participation : conseil, aide à l'identification, aide aux tests de sensibilité...

## Autres collaborations

- Equipe de mycobactériologie animale de Laura Boschioli à l'Agence Française de Sécurité Animale (AFSA)
- Equipe d'immunologie clinique et fondamentale du Pr Brigitte Autran (Pitié-Salpêtrière) avec laquelle notre laboratoire est déjà fortement associé dans le cadre du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière : Institut Fédératif de Recherche « Infection et Immunité » (IFR 113) et Centre d'Investigations Biomédicales.

## Equipes

### Laboratoire coordonnateur Pitié-Salpêtrière

- 1 PU-PH chef de service, 1 PU-PH, 3 MCU-PH, 1 AHU et 1 PH du service de Bactériologie-Hygiène du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (AP-HP) et Université Paris 6 (temps partiel)
- **1 médecin contractuel (PHC, 1ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **2 Techniciens financés par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (2 ETP)**
- 2 Techniciens (temps partiels, financement AP-HP)
- 1 Secrétaire (temps partiel, financement AP-HP)
- 1 Technicien de recherche en chimiothérapie expérimentale (financement fonds associatifs)
- 1 Technicien de recherche en biologie moléculaire (financement Université Paris 6)
- 1 Animalier (financement fonds associatifs)

### Laboratoire associé Saint Louis-Lariboisière

- 1 PU-PH chef de service, 1 PH et 1 Praticien attaché du service de Bactériologie du Groupe Hospitalier Saint Louis – Lariboisière (AP-HP) et Université Paris 7 (temps partiel)
- **1 Technicien financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (1 ETP)**
- 2 Techniciens (temps partiels, financement AP-HP)
- 1 Secrétaire (temps partiel, financement AP-HP)

Des étudiants en Master 2 et en Thèse encadrés par nos équipes d'accueil (EA 1541 et EA3964) et l'équipe INSERM (EMI 004 ERS5) participent aux travaux de recherche menés en collaboration avec le CNR (au total 4 à 6 étudiants présents simultanément).



## Personnel, locaux et équipement du CNR-MyRMA en 2012

Liste nominative des personnels participants aux activités du laboratoire coordonnateur (Pitié) et du laboratoire associés (Lariboisière) : fonction, temps dédié au CNR-MyRMA en 2012, qualification, statut, site et organisme payeur

Nom	Prénom	Fonction	ETP	Qualification	Statut	Site	Organisme payeur
Jarlier	Vincent	Directeur CNR	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Cambau	Emmanuelle	Responsable laboratoire associé	0,25	Médecin biologiste	PU-PH	Lariboisière	AP-HP
Vezeris	Nicolas	Microbiologiste Pneumologue	0,5*	Médecin	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Bernard	Christine	Microbiologiste	1	Pharmacien biologiste	PH	Pitié	<u>INVS</u>
Raskine	Laurent	Microbiologiste	0,25	Médecin biologiste	PH	Lariboisière	AP-HP
Aubry	Alexandra	Microbiologiste	0,1	Médecin biologiste	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Brossier	Florence	Microbiologiste	0,5**	Pharmacien biologiste	PH	Pitié	AP-HP
Sougakoff	Wladimir	Microbiologiste (Biol. moléculaire)	0,25	Scientifique	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Robert	Jérôme	Epidémiologiste	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Simonney	Nancy	Immunologiste	0,25	Médecin	Attachée	Lariboisière	AP-HP
Rigoreau	Martine	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	AP-HP
Wichlacz	Claudine	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	AP-HP
Millot	Gérald	Technicien	0,5	Technicien	Tech	Pitié	AP-HP
Rasaova	Niriana	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	<u>INVS</u>
Levittas	Marine	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	<u>INVS</u>
Charlier	Véronique	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Brisilliat	Christine	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Moiline	Myriam	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Lariboisière	<u>InVS</u>
Catalano	Francesca	Secrétaire	0,25	Secrétaire		Pitié	AP-HP

\*jusqu'en juillet 2012 - \*\*à partir de juillet 2012



## Locaux

### Laboratoire coordonnateur

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, 2<sup>e</sup> étage du bâtiment de la Pharmacie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, superficie totale du laboratoire 1000 m<sup>2</sup>.

Les activités se déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité L3 (150 m<sup>2</sup>) consacré à la mycobactériologie (et aux alertes Biotox).
  - dans les pièces adjacentes consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie fluorescente) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage...).
- La gestion informatique des réseaux partenaires, ainsi que l'animalerie de chimiothérapie expérimentale, sont localisées dans la partie universitaire du laboratoire, au 5<sup>e</sup> étage de la Faculté de Médecine, située sur le même campus.

### Laboratoire associé

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal, site Lariboisière, situé au 2<sup>e</sup>me étage du bâtiment CIVIALE, superficie totale du laboratoire de 964 m<sup>2</sup>.

Les activités du CNR se déroulent :

- dans laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 sous la forme d'une construction modulaire à l'extérieur du bâtiment Civiale.
- dans des pièces (39 m<sup>2</sup>) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (microscopie), de leur contenu génétique (biologie moléculaire : identification, détection de mutation...) après inactivation : laboratoire de biologie moléculaire et laboratoire de microscopie fluorescente.

## Principaux équipements

### Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

#### *Laboratoire de sécurité L3*

- équipements pour le traitement des prélèvements médicaux, cultures en milieux solides et liquides,
- équipements pour antibiogrammes en milieu solide et liquide,
- équipements pour l'identification phénotypique classique,
- équipement pour l'extraction d'acides nucléiques (cf. ci-dessous),
- 5 postes de sécurité microbiologiques,
- 6 incubateurs,
- automate de culture en milieu liquide,
- caméra de lecture de plaque sensititre et logiciel de lecture et d'interprétation VIZION®,
- microscopes à fluorescence lampe vapeur de mercure et lampe LED, microscopes classiques,
- sorbonne pour la coloration de Ziehl-Neelsen,
- colorateur de lames,
- coagulateur pour la préparation des milieux de Lowenstein-Jensen.

#### *Biologie moléculaire*

- extracteur d'acide nucléique de sécurité (pression négative) Roche MagNA Pure,
- extracteur d'acide nucléique automatisé QIAcube (QUIAGEN),
- 2 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Biorad iCycler, Biorad DNAEngine),
- 2 amplificateurs automatisés pour PCR « en temps réel » (MJResearch PTC-200, ABI7000),
- matériel d'hybridation manuel TwinCubator pour les bandelettes Hain,
- automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain,



- séquenceurs ADN : un monocapillaire ABI 310 (dans le laboratoire) ; un 16 capillaires ABI (sur plateforme de site dédiée aux analyses de biologie moléculaire),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé Biorad CEF-DR2,
- logiciel Gel Compar pour l'analyse des profils de génotypage,
- 1 imageur Biorad Chemidoc-XRS pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV et des membranes d'hybridation en chimioluminescence,
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques Pharmacia Gene Quant II,
- matériel d'hybridation/lecture Accuprobe (BioMérieux).

#### **Equipements accessibles sur la plate-forme génomique de la Pitié-Salpêtrière**

- microdosage des acides nucléiques sur spectrophotomètre Nanodrop,
- PCR temps réel haute capacité MX4000 et Mx3005,
- bioanalyseur 2100 Agilent pour analyse des acides nucléiques sur puce,
- séquenceur d'ADN Applied Biosystem 16 capillaires,
- plateforme de séquençage haut-débit (ILLUMINA HiSeq 2000),
- plateforme de génotypage de SNP à haut débit « ILLUMINA » (puces BeadChips),
- scanner pour lecture des lames microarrays hybridées avec sondes Cy3/Cy5,
- 3 spectromètres microplaques 384,
- spectromètre de masse Maldi-tof,
- spectromètre de masse NanoLC-ESI-MS/MS,
- robot de fractionnement Freedom EVO150 (Tecan).

#### **Animalerie (capacité totale : 2000 à 2500 souris) :**

- 4 isolateurs rigides et 8 armoires pour maintenance des animaux infectés en pression négative,
- 4 isolateurs souples pour maintenance des animaux immunodéficients,
- 2 postes de sécurité microbiologique pour les dissections et cultures,
- 4 étuves,
- autoclave pour destruction des déchets,
- accès à l'animalerie A3 de la faculté de médecine Pierre-et-Marie Curie.

#### **Laboratoire associé (Groupe hospitalier St Louis-Lariboisière)**

##### **Laboratoire de sécurité L3 (mobile) (30m2)**

- Equipement pour le traitement des échantillons médicaux,
- 3 postes de sécurité microbiologique,
- 3 incubateurs (30 et 37°C) pour milieux solides et liquides,
- 3 automates de culture en milieu liquide (MGIT960TB®, Becton-Dickinson) et 1 module Hémoculture Mycobactérie (BacTAlert®, Mérieux),
- Équipement complet de mycobactériologie médicale classique (réactifs de décontamination, centrifugeuses, coloration auramine et Ziehl, microscopes à fluorescence...),
- Matériel et équipement pour identification rapide phénotypique,
- Equipement et automate pour antibiogramme en milieu liquide MGIT,
- 1 module de suivi et d'analyse de la sensibilité des isolats aux antituberculeux de 1ère et seconde ligne (TB eXiST BD),
- 1 Système de lecture de microplaques Sensititre et logiciel de lecture et d'interprétation VIZION®.

##### **Biologie Moléculaire**

- 2 extracteurs automatiques d'acide nucléique (EZ1 QIAGEN et Arrow NORDIAG),
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques (Heliosy Thermos),
- 1 spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000,
- 5 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR,



- 1 amplificateur automatisé pour PCR « en temps réel » (Cepheid 4 modules),
- 2 amplificateurs pour PCR « en temps réel » (Rotor Gene et Smart Cycler),
- 1 automate d'hybridation GT-Blot 20 pour les bandelettes Hain Biocentric,
- 1 système d'hybridation manuelle TwinCubator,
- 2 séquenceurs 16 capillaires Applied Biosystem d'accès facile (commun à plusieurs laboratoires),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- 1 équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé (Pharmacia LKB Gene Navigator),
- 1 imageur (GelDoc XR Biorad) pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV,
- 1 automate pour électrophorèse capillaire d'ADN (Agilent) commun à plusieurs laboratoires pour test de génotypage Diversilab®,

#### **Autres équipements**

- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex, Bruker),
- Automate d'immuno-analyse ETIMAX2000, pour le dosage d'interféron gamma par le test Quantiféron® Gold in Tube (Cellestis),
- 1 autoclave de destruction.

## **Démarche qualité**

### **Guide de bonne exécution des analyses (GBEA)**

Le groupe de mycobactériologistes des CHU (« AZAY mycobactéries ») a rédigé un GBEA commun disponible sur le site « [azaymycobacteries.free.fr](http://azaymycobacteries.free.fr) » et sur [www.microbes-edu.fr](http://www.microbes-edu.fr), et accessibles via le site <http://CNR-MyRMAmyctb.free.fr>. Ce guide comporte les chapitres suivants :

**Mode opératoire** : Préparation technique, Décontamination des prélèvements, Colorations et Examen microscopique, Culture des mycobactéries sur milieux spécifiques, Identification des mycobactéries par méthodes phénotypiques et génotypiques, Antibiogramme des mycobactéries par méthodes phénotypiques et génotypiques, Amplification génique pour diagnostic.

**Procédure** : Les mycobactéries, Hygiène et sécurité, Contrôle de qualité, Elimination des déchets, Biologie moléculaire, Souchothèque.

**Procédure annexe** : Prélèvements.

Ce groupe s'est aussi engagé dans la rédaction de **recommandations de Juste Prescription Biologique** des examens de mycobactériologie, sous la responsabilité conjointe de C. Martin et E. Cambau.

### **Accréditation**

Le CNR-MyRMA s'est inscrit dans la démarche d'accréditation des laboratoires (norme NF EN ISO 15189) par l'intermédiaire des groupes hospitaliers auxquels le laboratoire coordonnateur et la laboratoire associé appartiennent, respectivement le Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (AP-HP) et le Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal (AP-HP). Le CNR-MyRMA participe au travers de ses membres à plusieurs groupes de travail mis en place pour l'accréditation de l'ensemble des laboratoires: (1) gestion des non-conformités, (2) contractualisation prescripteurs/ laboratoires (3) infrastructures et locaux. Ces groupes de travail incluent des membres du CNR-MyRMA et, plus largement, ceux des laboratoires hébergeant le CNR.

### **Participation du CNR-MyRMA aux contrôles de qualité externe supranationaux**

Le CNR-MyRMA a participé à plusieurs contrôles de qualité externe en 2012 :

- 1 série de contrôles de différentes étapes du diagnostic de la tuberculose (examen microscopique, culture,



tests de sensibilité, amplification génique et détection moléculaire de la résistance) organisés dans le cadre du réseau européen de l'ECDC ERLNET-TB

- 1 série de contrôle de détection moléculaire de la résistance chez *M. leprae* organisée dans le cadre du réseau de l'OMS sur la surveillance de la résistance aux antiléproux.

Le CNR-MyRMA participe aussi chaque année aux contrôles de qualité européens de génotypage MIRU-VNTR en tant que membre du Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis organisé par D. van Soolingen (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas).

Pour chaque contrôle, trente extraits d'ADN de *M. tuberculosis* envoyés par le RIVM sont analysés en MIRU-VNTR 24. Les résultats du premier contrôle qualité réalisé en 2009-2010 ont été analysés et publiés en 2012 (*First Worldwide Proficiency Study on Variable-Number Tandem-Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains. de Beer JL, Kremer K, Ködmön C, Supply P, van Soolingen D; the Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis 2009. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):662-669*). Les résultats obtenus par le CNR-MyRMA sont très bons.

## Traçabilité

La traçabilité concerne principalement les échanges entre les laboratoires demandeurs et les 2 laboratoires du CNR-MyRMA mais peut aussi concerner les échanges entre le laboratoire coordonnateur et le laboratoire associé. Il faudra à l'avenir rédiger des procédures spécifiques à cet effet.

### **Traçabilité des demandes et des résultats**

Les feuilles de demande d'expertise et leurs éventuelles pièces jointes (compte rendu d'un dossier patient, feuille des résultats obtenus dans le laboratoire demandeur) étaient archivées telles quelles jusqu'en novembre 2012, date à laquelle le nouveau système de gestion de laboratoire (GLIMS, Société MIPS) a été mis en place. Depuis, les demandes et pièces jointes sont saisies et archivées via un scanner spécifique (ScanBac® Ordo) dans le SGL du laboratoire coordonnateur. Une copie des demandes transmises au laboratoire associé sera conservée par le laboratoire coordonnateur.

La traçabilité des rendus de résultats est établie pour les paramètres suivants : identité des correspondants (biologiste, clinicien, autorité sanitaire), mode de rendu (téléphone, fax, email, courrier), date et heure, résultats intermédiaires rendus en urgence.

Les données sont conservées pendant au moins 5 ans pour les résultats intermédiaires (listes de travail, cahiers de paillasse) et pendant au moins 20 ans pour les résultats définitifs. A l'avenir, une sauvegarde informatique automatisée sera assurée par les services informatiques centraux de l'AP-HP. De plus, des résultats seront

### **Traçabilité des matériels reçus et conservés**

Les tubes de conservation des souches, prélèvements ou autres (extrait ADN par exemple) sont numérotés (numérotation spécifique) et classés.

### **Traçabilité des réunions de travail**

Les réunions du « Groupe thérapeutique » et les réunions mensuelles des membres du CNR-MyRMA sont tracées par une feuille de présence et un compte rendu écrit. Si le projet de visio-conférences du « Groupe thérapeutique » aboutit, celles-ci seront enregistrées (cf projet).



## 2. Activités d'expertise

### 2.1. Capacités techniques du CNR

#### Techniques disponibles

##### Techniques phénotypiques

###### **Techniques de diagnostic**

- Microscopie,
- Cultures en milieux solides et liquides,
- Amplification génique.

###### **Techniques d'identification**

- Techniques phénotypiques classiques (caractères cultureux, morphologiques et biochimiques),
- Immunochromatographie (AgMPT64®, Eurobio Biocentric),
- Spectrométrie de masse en MALDI-TOF.

###### **Techniques phénotypiques d'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux**

###### Techniques de routine

- Antibiogrammes par la méthode de référence (méthode des proportions) en milieu de L-Jensen industriels pour *M.tuberculosis*. Les milieux pour tester la sensibilité aux antibiotiques de 2ème ligne (kanamycine, amikacine, capréomycine, fluoroquinolones, thioamides, cyclosérine, PAS, linézolide et thiacétazone) n'étant plus commercialisés, ils sont préparés et contrôlés par le CNR-MyRMA,
- Antibiogrammes par la méthode de référence (méthode des proportions) sur milieu liquide (MGIT960 TB),
- Antibiogrammes par la méthode des proportions pour *M.kansasii*, sur milieux de L.Jensen industriels (isoniazide, éthambutol) ou fabriqués et contrôlés au laboratoire (rifampicine) car les milieux industriels contiennent non pas de la rifampicine vraie mais de la rifamycine SV, dérivé auquel *M.kansasii* est naturellement résistant,
- Détermination des CMI en milieu de L. Jensen (clarithromycine, fluoroquinolones, éthambutol, rifabutine, amikacine) pour les mycobactéries à croissance lente. Ces milieux, non disponibles dans le commerce, sont préparés et contrôlés au laboratoire,
- Détermination des CMI en milieu liquide sur microplaque (Trek®) pour les mycobactéries à croissance lente et rapide (imipénème, cefoxitine, amikacine, streptomycine, tobramycine, clarithromycine, ciprofloxacine, moxifloxacine, linézolide, minocycline, docycycline, tigecycline, triméthoprime-sulfaméthoxazole, rifampicine, rifabutine, isoniazide, éthionamide, éthambutol),
- Détermination des CMI en milieux liquides ou solides pour les mycobactéries à croissance lente : aminosides, rifamycine, fluoroquinolones ou autres selon les besoins,
- Détermination des CMI par bandelettes E-test pour les mycobactéries à croissance rapide,
- Pour *M.leprae* : inoculation dans le coussinet plantaire de la souris (Swiss et Nude) et observation de la croissance bactérienne chez les animaux traités avec les antibiotiques, par comparaison avec des animaux témoins non traités. Le résultat est disponible après 8 à 12 mois.



Techniques pour l'évaluation de l'activité de nouveaux antibiotiques

- Méthodes in vitro : CMI, étude de la bactériostase (MGIT avec module d'analyse TB eXiST BD), bactéricidie, inhibition des fonctions enzymatiques de l'ADN gyrase (IC<sub>50</sub>) pour les fluoroquinolones,
- Méthodes in vivo : modèles de chimiothérapie expérimentale chez la souris pour *M.tuberculosis*, *M.leprae*, *M.ulcerans*, *M.avium*, *M.abscessus*.

**Techniques génotypiques**

Les techniques génotypiques utilisées sont listées dans le **Tableau 1**, séparément pour l'identification, les tests de sensibilité aux antimycobactériens (mutations impliquées dans la résistance acquise) et le génoypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques).

**Tableau 1 : Techniques génotypiques utilisées au CNR-MyRMA**

**a. Identification bactérienne**

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène
Complexe <i>tuberculosis</i>	Accuprobe® Xpert® MTB/RIF GenoType®MTBDR <sub>plus</sub> GenoType®MTBDR <sub>sl</sub> Real Accurate Mycobacterium tuberculosis (Patho Finder)®	
Espèces au sein du complexe <i>tuberculosis</i>	Genotype MTBC® MIRU-VNTR 12-24 loci	
Mycobactéries atypiques "courantes"	Accuprobe Genotype® CM	
Mycobactéries atypiques "rares"	Genotype® AS	
Toutes les mycobactéries		<i>rpoB</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> ARN 16S et 23S <i>hsp65</i> <i>erm41</i>
Complexe <i>abscessus</i>		<i>erm41</i>
<i>M. ulcerans</i>		IS2404
<i>M. leprae</i>	GenoType®LepraeDR	RLEP

**b. Détection de mutations déterminant la résistance acquise aux antimycobactériens**

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène	Antibiotiques
Complexe <i>tuberculosis</i>	CepheidXpert RIF MTBDR <sub>plus</sub> <sup>a</sup> MTBDR <sub>sl</sub> <sup>b</sup>	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>pncA</i> <i>ethA</i> <i>ethR</i> <i>rrs</i> <i>rpsL</i>	rifampicine rifampicine, isoniazide, éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, éthambutol, fluoroquinolones isoniazide isoniazide, éthionamide pyrazinamide éthionamide éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, streptomycine streptomycine



Toutes <b>mycobactéries</b>	<i>embB</i>	éthambutol
	<i>rpoB</i>	rifampicine
	<i>gyrA</i>	fluoroquinolones
	<i>gyrB</i>	fluoroquinolones
<i>M. abscessus</i>	<i>erm41 et rrl</i>	macrolides
Mycob. atypiques	<i>rrl</i>	macrolides
<i>M. leprae</i>	GenoType®	rifampicine, fluoroquinolones,
	LeptraeDR	dapsone

### c. Génotypage

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène
Complexe <i>tuberculosis</i>	MIRU-VNTR 12-24 loci	RFLP IS6110
Mycobac atypiques	Diversilab®	Electrophorèse en champ pulsé REP-PCR

## Mise au point et évaluation de nouvelles techniques en 2012

**Evaluation des performances de la PCR qualitative multiplex Bio-Rad assay *Dx MTB* assay pour la détection de *M. tuberculosis complex (MTBC)* et la différenciation des souches en 2 groupes: *M. tuberculosis* et *M. canettii* (groupe 1, présence des séquences IS6110 et RD9), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* et *M. caprae* (groupe 2, présence de la séquence IS6110 seulement).**

Le test est pratiqué après décontamination/ fluidification et repose sur 2 étapes : une extraction manuelle par Chelex puis une amplification automatique couplée à la détection des cibles par PCR en temps réel. Le test inclut des contrôles d'extraction et d'amplification.

764 spécimens ont été inclus dans l'étude : 320 expectorations, 145 aspirations trachéales, 162 lavages broncho-alvéolaires, 125 aspirations gastriques, 6 LCR, 1 urine, 1 ganglion, 1 prélèvement cutané, 2 pus and 1 liquide pleural. Pour un même patient, un ou plusieurs spécimens ont été collectés.

Ont aussi été étudiés 27 spécimens de patients connus pour contenir *M. tuberculosis* : 15 expectorations, 1 aspiration trachéale, 1 lavage broncho-alvéolaire et 10 aspirations gastriques.

Tous les spécimens ont été aussi testés par la méthode PCR TaqMan (Real Accurate Mycobacterium tuberculosis TaqMan assay).

### **Performance par rapport à la culture prise comme gold standard**

#### Spécificité du test Dx MTB

Calculée sur les 682 spécimens négatifs pour *M. tuberculosis* dont 32 étaient positifs pour d'autres mycobactéries (11 *M. intracellulare*, 1 *M. kansasii*, 3 *M. fortuitum*, 3 *M. gordonae*, 1 *M. peregrinum*, 1 *M. simiae*, 10 *M. xenopi*, 1 *M. chimerae*, 1 *M. spp*) moins les 6 dont le résultat était invalide en raison de la présence d'inhibiteur de l'amplification.

99,41% - IC 95% [98,49 – 99,84%]

N.B. les 32 spécimens contenant d'autres mycobactéries ont donné des résultats négatifs avec le test Dx MTB.



### Spécificité du test Real Accurate MTB

Calculée sur les 682 spécimens négatifs pour *M.tuberculosis* dont 32 étaient positifs pour d'autres mycobactéries (11 *M.intracellulare*, 1 *M.kansasii*, 3 *M.fortuitum*, 3 *M.gordonae*, 1 *M.peregrinum*, 1 *M.simiae*, 10 *M.xenopi*, 1 *M.chimerae*, 1 *M.spp*) moins les 13 dont le résultat était invalide en raison de la présence d'inhibiteur de l'amplification.

97,31% - IC 95% [95,78 – 98,40%]

### Agrément entre Dx MTB et Real Accurate MTB pour les spécimens négatifs

Real Accurate MTB	Dx MTB			Total
	invalide	MTB_neg	MTB_pos_ND	
invalide	3	10		13
Négatif	3	644	4	651
Positif		18		18
Total	6	672	4	682

Au total, après exclusion des résultats invalides, l'agrément entre les 2 méthodes était de 96,7% (644/644+18+4).

### Analyse des résultats discordants

18 des 22 résultats discordants étaient liés à une fausse positivité du test Real Accurate MTB et 4 au test Dx MTB. Ces derniers étaient en fait faiblement positifs et trouvés négatifs lors d'un test suivant.

### Sensibilité du test Dx MTB

Globale : 85,32% - IC 95% [77,26 – 91,37%]

Spécimens microscope - : 60,98% - IC 95% [44,50 – 75,80%]

Spécimens microscope + : 100% - IC 95% [94,56 – 100%]

### Sensibilité du test Real Accurate MTB

Globale : 89,91% - IC 95% [82,66 – 94,85%]

Spécimens microscope - : 73,17% - IC 95% [57,06 – 85,78%]

Spécimens microscope + : 100% - IC 95% [94,56 – 100%]

### Agrément entre Dx MTB et Real Accurate MTB pour les spécimens positifs

Real Accurate MTB	Dx MTB				Total
	MTB_neg	MTB_pos_Groupe1	MTB_pos_Groupe2	MTB_pos_ND	
Négatif	9			2	11
Positif	7	72	3	16	98
Total	16	72	3	18	109

L'agrément entre les 2 méthodes était de 91,7% (9+72+3+16/ 109).

### Analyse des résultats discordants

2 des 9 résultats discordants étaient négatifs par Real Accurate MTB alors que les 7 autres étaient négatifs par Dx MTB. 9 spécimens culture + étaient négatifs par les 2 méthodes.



### Distinction entre les sous espèces de *M.tuberculosis*

Parmi les 6 spécimens à *M.bovis*, 2 étaient positifs et identifiés comme du groupe 2, 3 étaient positifs mais sans précision du groupe et 1 était négatif. Le seul spécimen à *M.africanum* était positif mais sans précision du groupe.

### **Conclusion**

L'extraction par la méthode Dx MTB assay est rapide et fiable. L'amplification est adaptée à la routine. La sensibilité globale du test est de 85,2%, un peu inférieure à celle du test Real Accurate *Mycobacterium tuberculosis* PCR kit (89,9%). Le léger avantage du test Real Accurate MTB test est dû surtout à la détection de 7 spécimens à culture faiblement positive (3 à 10 colonies sur LJ) qui ont donné une faible amplification mais pas d'amplification par Dx MTB assay. La spécificité globale du test est très élevée (99,4%), un peu supérieure à celle du test Accurate *Mycobacterium tuberculosis* PCR kit (97,3%).

### **Mise au point d'une technique de REP-PCR semi-automatisée (DiversiLab®) pour l'identification et la détection de clonalité (génotypage) au sein du complexe *M. abscessus***

*M. abscessus* est une mycobactérie atypique à croissance rapide responsable d'infections pulmonaires chroniques sur terrain prédisposant, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose pour lesquels cette espèce représente la moitié des mycobactéries atypiques responsables d'infections. Cette espèce est aussi responsable d'infections extra-pulmonaires iatrogènes même chez les sujets immunocompétents, par inoculation via du matériel souillé par la bactérie présente dans l'environnement. Les méthodes de taxonomie moléculaire comme la technique Multilocus Sequence Typing (MLST) ont permis de décrire un complexe *M. abscessus* hétérogène composé de trois sous espèces : *M. abscessus sensu stricto*, *M. bolletii* et *M. massiliense*.

Nous avons appliqué la rep-PCR DiversiLab® d'une part sur 87 souches cliniques de la collection du CNR-MyRMA, d'autre part sur 35 souches de *M. abscessus* isolées de façon répétée sur une période d'un an, chez quatre patients atteints de mucoviscidose suivis à l'hôpital Necker Enfants Malades. L'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le kit UltraClean microbial DNA et la rep-PCR en utilisant le kit d'empreinte spécifique du genre *Mycobacterium*. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse capillaire à travers la puce LabChip Agilent. Les résultats ont été ensuite analysés sur le site Internet DiversiLab®.

Pour les souches de la collection du CNR-MyRMA, nous avons observé des profils électrophorétiques différents pour 54 souches, et 35 souches étaient regroupées en 12 clusters de 2 à 6 souches par cluster. Ceci montre une grande diversité clonale de ces souches avec un pouvoir discriminant supérieur à 98%. Pour chacun des patients atteints de mucoviscidose, les souches étaient non différenciables à l'exception d'un patient qui avait 2 groupes de souches qui se sont succédées dans le temps. Chaque patient avait donc une souche ou groupe de souches uniques.

En conclusion, la rep-PCR semi-automatisée apparaît fiable comme méthode de génotypage standardisée et rapide. Elle peut être utile pour déterminer la clonalité des souches au sein du complexe *M. abscessus*.

### **Identification des mycobactéries par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS)**

Nous avons en 2010 publié les résultats de l'évaluation de l'identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) des mycobactéries en utilisant la base de données « ANDROMAS » mise au point localement à l'hôpital Necker par l'équipe du Pr Xavier Nassif. Les résultats étaient convenables au prix de 2 à 5 répétitions du test pour chaque souche, ce qui en routine est fastidieux (Lotz et al, J Clin Microbiol 2010).

C'est pourquoi nous avons voulu en 2012 évaluer les performances de la technique MALDI-TOF en utilisant la base de données fournie par le fabricant (Bruker) en nous concentrant sur 15 espèces de mycobactéries essentielles (en moyenne 3 souches par espèce), toutes précisément identifiées par technique moléculaire (séquençage des gènes *hsp* et *rpoB*).

Les souches ont été cultivées en milieu de Löwenstein-Jensen (LJ) et en milieu liquide (MGIT). Nous avons utilisé 3 méthodes de préparation pour chaque souche : celle recommandée par le fabricant, celle recommandée par l'équipe de bactériologie de Marseille, et une méthode combinée « maison ».

Les résultats se sont avérés très insuffisants, l'identification fournie étant même parfois une espèce non



mycobactérienne (*Streptomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*...).

Nous avons débuté une collaboration avec une équipe de Gif-sur-Yvette spécialisée dans la spectrométrie de masse pour améliorer ces résultats.

## Collections de souches de référence

### Description des souches

Nous mettons à disposition des laboratoires, des souches de *M.tuberculosis* résistantes aux antituberculeux de première ligne. Dans un 1<sup>er</sup> temps, pour répondre aux besoins dans ce domaine et dans l'objectif d'aider à rationaliser les tests de sensibilité aux antituberculeux, mais aussi avec le souci d'éviter les échanges de souches multirésistantes qui sont hautement dangereuses, nous avons préparé des souches monorésistantes (à l'isoniazide, haut et bas niveau de résistance, à la rifampicine, à la streptomycine et à l'éthambutol). Pour cela, des mutants résistants ont été sélectionnés in vitro lorsque des souches d'origine clinique n'étaient pas disponibles (**Tableau 2**).

Pour chaque souche de cette collection, le phénotype de résistance a été confirmé par la méthode des proportions (méthode de référence pour les antibiogrammes de *M.tuberculosis*), quantifié par la détermination de la concentration minima inhibitrice et le mécanisme de résistance a été caractérisé génétiquement.

**Tableau 2. Souches monorésistantes aux antituberculeux de première ligne disponibles au CNR pour contrôle de qualité avec leurs noms et caractéristiques génétiques et phénotypiques**

Souche de <i>M.tuberculosis</i>	Génotype	Phénotype de résistance en milieu de Löwenstein Jensen
Isoniazide bas niveau	<i>inhA</i> -15CT	100% résistance isoniazide 0,2 mg/l, sensible
Isoniazide haut niveau	<i>KatG</i> S315T	100% résistance isoniazide 1 mg/l, sensible 10 mg/l
Rifampicine	<i>RpoB</i> S531L	100% résistance rifampicine 40 mg/l
Streptomycine	<i>RpsI</i> L43A	100% résistance streptomycine 4 mg/l

Par ailleurs le laboratoire conserve des souches de référence achetées à la Collection de l'Institut Pasteur ou à l'American Type Culture Collection qu'il utilise pour des études de recherche appliquée ou fondamentale.

Enfin le laboratoire conserve l'ensemble des souches adressées pour expertise pour une durée de 10 ans.

### Condition de stockage

Le stockage de l'ensemble de ces souches est faite par le biais d'un souchier dont le fichier est stocké sur un ordinateur situé sur le réseau de l'hôpital Pitié-Salpêtrière et bénéficiant de ce fait d'une sauvegarde.

Les souches sont conservées dans du 7H9 glycérolé dans un congélateur à -80°C.

Les lépromes reçus au CNR-MyRMA pour recherche de *M.leprae* sont conservés à -80°C.

Parallèlement à la conservation des souches, le CNR s'est équipé en 2010 d'un congélateur -40°C spécifiquement dédié à la conservation des ADN extraits des souches pour lesquelles une analyse de biologie moléculaire est demandée.

### Conditions de mise à disposition des collections

Les souches sont à la disposition de tous les laboratoires et sont envoyées sur demande. Elles ont déjà été mises à la disposition des laboratoires de microbiologie du groupe Azay-mycobactéries (constitué par une trentaine de laboratoires des hôpitaux universitaires participant à la surveillance de la résistance primaire et secondaire) pour ceux qui voulaient organiser des contrôles de qualité internes.

Les souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux ne sont disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français possédant un local de sécurité biologique de niveau 3 (P3) et réalisant des tests de sensibilité. Les souches résistantes aux antituberculeux de deuxième ligne ne seront disponibles



que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français réalisant des tests de sensibilité de deuxième ligne.

## **Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR-MyRMA pour les laboratoires de Bactériologie médicale**

- Microscopie à fluorescence avec lampe LED ou optique après coloration de Ziehl-Neelsen,
- Cultures en milieu solides et liquides,
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* par amplification génique (ex. hybridation sur bandelettes genre Genotype ®...) directement à partir des prélèvements lorsque l'examen microscopique est positif,
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* dans les cultures par hybridation directe avec sonde Accuprobe® ou amplification-hybridation sur bandelettes (ex. Genotype ®...) ou techniques immunochromatographiques (exkit SD BioLINE TB Ag MPT64, Eurobio),
- Identification des mycobactéries atypiques courantes (*M.gordoniae*, *M.avium-intracellulare* complex, *M.kansasii*) dans les cultures par hybridation directe avec sonde Accuprobe® ou amplification-hybridation sur bandelettes (Genotype ®...),
- Tests de sensibilité aux antibiotiques de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol) par méthode des proportions en milieu solide ou liquide,
- Recherche de mutation dans le gène *rpoB* pour le diagnostic de la résistance à la rifampicine en cas de suspicion de multirésistance (antécédents de traitement, séropositivité VIH, malade originaire d'un pays à forte prévalence de résistance...), par PCR avec sondes intégrées ou hybridation sur bandelettes ou séquençage.

Sur la base de l'arrêté du 16 juillet 2007 et des recommandations européennes sur le confinement dans les laboratoires de biologie, la manipulation des échantillons destinés à la recherche de mycobactérie requière les conditions suivantes :

- examen microscopique et mise en culture : confinement L2,
- identification rapide d'une culture positive sans subculture (immunochromatographie, hybridation sur sonde sans amplification, amplification-hybridation sur bandelette, amplification avec sonde intégrée) : confinement L2,
- subcultures de mycobactéries atypiques (ex. antibiogramme) : confinement L2,
- subcultures de *M.tuberculosis* complexe (ex. antibiogramme) : confinement L3.

**Afin de pouvoir le plus rapidement possible fournir au personnel soignant prenant en charge les patients suspects et l'entourage familial de ces patients, l'identification des cultures positives doit être rapidement possible et menée avec des techniques applicables dans tous les laboratoires pratiquant les primocultures et ne nécessitant pas de subculture :**

- immunochromatographie (très rapide, peu coûteux),
- amplification génique suivie d'une hybridation réverse sur bandelette,
- amplification génique en temps réel avec hybridation sur sondes intégrées.

## **Contrôles de qualité externe organisé par le CNR-MyRMA**

Nous organisons depuis 2003, tous les 2 ans environ, un contrôle de qualité externe (CQE) des tests de sensibilité aux antituberculeux dans le cadre de l'enquête sur la résistance primaire et secondaire effectuée chaque année par les laboratoires du réseau Azay-mycobactéries (cf plus loin « Surveillance de la résistance primaire et secondaire »).

Le prochain CQE sera organisé à l'automne 2013.



## 2.2. Activités d'expertise assurées par le CNR pour les laboratoires français en 2012

### Nombre de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA

Au cours de l'année 2012 le CNR-MyRMA a reçu **1122 souches et prélèvements** pour identification et/ou typage moléculaire et/ou étude de la sensibilité aux antibiotiques (**Tableau 3**). Les souches et prélèvements proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et DOM-TOM (laboratoires hospitaliers, LABM...).

### **Tendances évolutives 2006-2012**

Alors que le nombre de souches et de prélèvements reçus a peu évolué depuis 2007, il y a eu une modification importante du travail effectué sur le matériel. Le nombre de souches de *M.tuberculosis* a augmenté alors que le nombre de souches de mycobactéries atypiques a diminué en raison des demandes répétées du CNR-MyRMA de se concentrer sur les souches responsables d'infection.

L'évolution principale concerne la quantité de travail effectuée sur les souches de *M.tuberculosis* :

- **25% d'augmentation** du nombre de souches pour lesquelles un antibiogramme de 1<sup>ère</sup> ligne a été fait,
- **25% d'augmentation** du nombre de souches pour lesquelles un antibiogramme de 2<sup>ème</sup> ligne a été fait, ce qui demande beaucoup de travail par l'utilisation d'une douzaine de milieux spécifiques non commercialisés qui doivent être préparés localement puis soumis à des contrôles de qualité,
- **40% d'augmentation** par rapport aux années 2007-2010 du nombre de souches pour lesquelles un génotypage a été fait.

### Identification des souches reçues

**897 souches ont été soumises à identification** de l'espèce mycobactérienne et, pour la plupart ont été aussi soumises à un antibiogramme phénotypique et/ou à des tests génotypiques de détection de résistance et/ou à un génotypage pour enquête épidémiologique : **430 souches du complexe *M. tuberculosis*** et **467 souches de mycobactéries atypiques**.

**Tableau 3 : Activité du CNR- MyRMA de 2007 à 2012 : nombre de souches et prélèvements reçus, détail des études mises en œuvre**

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>Total souches et Prélèvements reçus</b>	<b>1072</b>	<b>1100</b>	<b>1030</b>	<b>990</b>	<b>1206</b>	<b>1122</b>
<b>Souches soumises à identifications<sup>a</sup></b>	<b>825</b>	<b>944</b>	<b>873</b>	<b>794</b>	<b>988</b>	<b>897</b>
<i>M. tuberculosis</i>	370	452	369	366	385	430
Mycob. atypiques	455	492	504	428	603	467
<b>Souches soumises à tests phénotypiques de sensibilité</b>	<b>432</b>	<b>442</b>	<b>470</b>	<b>468</b>	<b>551</b>	<b>542</b>
<i>M. tuberculosis</i> <sup>b</sup>	170 (73)	185 (90)	170 (135)	160 (126)	170 (139)	217 (164)
Mycob. atypiques	262	227	300	308	381	325
<b>Souches soumises à génotypage<sup>c</sup></b>	<b>215</b>	<b>183</b>	<b>192</b>	<b>153</b>	<b>119</b>	<b>276</b>
<i>M. tuberculosis</i>	203	172	175	153	119	267
Mycob. atypiques	12	11	17	-	-	9
<b>Total prélèvements (hors <i>M.leprae</i>)</b>	<b>151</b>	<b>115</b>	<b>112</b>	<b>140</b>	<b>169</b>	<b>163</b>
<b>Biopsies <i>M.leprae</i><sup>d</sup></b>	<b>10 (2)</b>	<b>18 (7)</b>	<b>17 (7)</b>	<b>25 (7)</b>	<b>51 (22)</b>	<b>53 (24)</b>



a : une petite partie des souches reçues sont déjà connues ou sont contaminées ou ne sont en fait pas des mycobactéries et n'apparaissent ni dans « *M.tuberculosis* » ni dans « Mycob. atypiques »

b : dont (N) souches pour lesquelles il y a eu un **antibiogramme de 1<sup>er</sup> ligne et un de 2<sup>e</sup> ligne**

c : empreintes digitales génomiques (épidémiologie)

d : dont (N) biopsies correspondant à des cas de lèpre bactériologiquement confirmé

### Souches de *M. tuberculosis* complexe

Parmi les 430 souches de *M.tuberculosis* complexe reçues en 2012, 201 (47%) ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce, soit lorsque leurs caractères phénotypiques s'écartaient de ceux typiques de l'espèce *M.tuberculosis* (ex. souches lisses, dysgoniques...), soit en tirant profit du génotypage qui, pratiqué par la méthode des MIRU-24 loci, permet aussi de préciser l'espèce (cf. plus loin). Parmi ces 201 souches, **164** étaient de l'espèce *M. tuberculosis*, qui reste l'espèce principale responsable de tuberculose humaine, **13** étaient de l'espèce *M. bovis* var BCG (nombre à peu près stable depuis 2007), **13** souches étaient de l'espèce *M.bovis* (même ordre de grandeur que les années précédentes suggérant qu'il n'y a pas d'émergence de tuberculose à bacille bovin) et **8** souches étaient de l'espèce *M.africanum* (stable par rapport à 2007) (Tableau 4).

Tableau 4 : Identification des souches de mycobactéries du complexe *M.tuberculosis* reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2012

Espèces	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>M. tuberculosis</i> complexe sans identification au sein du complexe	<b>229</b>	<b>363</b>	<b>308</b>	<b>209</b>	<b>143</b>	<b>229</b>
Identification au sein du complexe <i>tuberculosis</i> * :	<b>141</b>	<b>89</b>	<b>61</b>	<b>157</b>	<b>242</b>	<b>201</b>
<i>M. tuberculosis</i>	114	63	42	140	212	164
<i>M. bovis</i>	9	11	7	6	12	13
<i>M. africanum</i>	10	11	5	6	7	8
<i>M. bovis</i> var BCG	8	4	3	5	9	13
<i>M. caprae</i>			2			
<i>M. canettii</i>					1	3
<i>M. microti</i>			2		1	
<b>Total <i>M. tuberculosis</i> complexe</b>	<b>370</b>	<b>452</b>	<b>369</b>	<b>366</b>	<b>385</b>	<b>430</b>

\* L'identification est menée par des méthodes génotypiques au sein du complexe *M.tuberculosis* lorsque le laboratoire envoyeur le demande, ou lorsque les aspects cultureux (milieu solide) évoquent une espèce autre que *M. tuberculosis* (ex. *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*...)

(*M.abscessus* complexe) et d'infections cutanées (*M.chelonae*, *M. bolletii*) mais aussi des infections disséminées chez des immunodéprimés (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*).

### Souches de mycobactéries atypiques

Parmi les 467 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2012, la répartition était la suivante (Tableau 5) :

- **205 souches (43% du total) du complexe *M.avium-intracellulare*** dont 100 *M.avium* et 105 *M.intracellulare*. La proportion des souches considérées comme responsables d'infections (n=166 soit 81%).



- **49 souches de *M.xenopi*** (10% du total). Toutes étaient d'origine respiratoire sauf 2 (isolées de biopsies d'os de spondylodiscite et de bursite du coude). Parmi ces souches, 34 (70%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **17 souches de *M.kansasii*** (3% du total), agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose. Parmi ces souches, 9 (60%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **7 souches de *M.simiae*** ont été considérées comme responsables d'infection.
- **4 souches de *M.marinum***, agent classique d'infections cutanées après inoculation à partir d'aquariums ou d'animaux aquatiques. Il n'y a pas eu en 2012 de cas groupés faisant craindre une exposition commune.
- **16 souches de *M.gordonae*** qui correspondaient toutes à des contaminations.
- **138 souches d'espèces à croissance rapide** (30% du total) réparties dans les espèces *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.abscessus*, *M.bolletii*, *M.massiliense*, *M.peregrinum*, *M.mucogenicum*, *M.llatzerense*, *M.septicum*. Au total, 70 des souches isolées chez des patients (51%) ont été considérées comme responsables d'infections, le plus souvent d'infections respiratoires dans le cadre de la mucoviscidose (*M.abscessus* complex) et d'infections cutanées (*M.chelonae*, *M.bolletii*) mais aussi des infections disséminées chez des immunodéprimés (*M.fortuitum*, *M.peregrinum*).

**Par ailleurs, 46 souches (10% environ) des souches de mycobactéries atypiques reçues en 2012 appartenaient à des espèces rares ou nouvellement décrites :**

- 6 souches appartenaient au complexe *terrae* (dont 2 fois *M.arupense* et 3 fois *M.kumamotoense* espèces proches de *M.terrae* et décrites en 2006 dont 2 souches considérées comme responsables d'infection (une de biopsie cutanée de la main et l'autre d'un pus de doigt)
- 2 souches de *M.genavense* isolées de biopsies ganglionnaires d'un même patient.
- 3 souches de *M.heckeshornense* (mycobactérie proche de *M.xenopi*, décrite en 2000) dont 2 considérées comme responsable d'infection (respiratoire et ganglionnaire)
- 3 souches de *M.lentiflavum* (mycobactérie proche de *M.simiae* et *M.genavense*, décrite en 1996), considérées comme des contaminants.
- 1 souche de *M.malmoense* considérée comme responsable d'infection respiratoire.
- 1 souche de *M.palustre* (espèce à croissance) considérée comme un contaminant.
- 11 souches de *M.massiliense* (espèce proche de *M.abscessus*, décrite en 2004) dont 6 considérées comme responsables d'infection (respiratoire exclusivement)
- 6 souches de *M.bolletii* (espèce proche de *M.abscessus*, décrite en 2006) toutes considérées comme responsables d'infection (exclusivement respiratoires).
- 2 souches de *M.mucogenicum* (espèce proche de *M.chelonae*, décrite en 1995) dont 1 souche considérée comme responsable d'infection respiratoire
- 2 souches de *M.llatzerense* (espèce à croissance rapide décrite en 2008) issues de prélèvements d'environnement.
- 1 souche de *M.nebraskense* (espèce à croissance lente décrite en 2004) considérées comme des contaminants.
- 1 souche de *M.triplex* (espèce à croissance lente décrite en 1996) souche considérée comme responsable d'infection respiratoire.
- 1 souche de *M.europaeum* (espèce à croissance lente décrite en 2011) isolée d'une adénopathie.
- 1 souche de *M.vulneris* (espèce à croissance lente proche de *M.avium* décrite en 2009) considérée comme responsable d'infection respiratoire.
- 1 souche de *M.septicum* (espèce à croissance rapide décrite en 2000) considérée comme un contaminant
- 1 souche de *M.gastri* (espèce proche de *M.kansasii*) considérée comme un contaminant.
- 1 souche de *M.parrafinicum* (espèce à croissance lente) considérée comme un contaminant.
- 2 souches de *M.chimerae* (espèce à croissance lente) dont 1 souche considérée comme responsable d'infection respiratoire.

**Au total, 325 (70%) des 467 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2012 ont été considérées comme responsables d'infections et ont faits l'objet de tests de sensibilité aux antibiotiques. Ce pourcentage, élevé, est en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses efforts sur les souches importantes au plan médical.**



### Tendances évolutives 2006-2012

Le nombre de souches de mycobactéries atypiques reçues et considérées comme responsables d'infection (et donc soumises à des tests de sensibilité aux antibiotiques, cf plus loin) a augmenté de 24% entre 2006 (n=262) et 2012 (n=325). La distribution entre les principales espèces de mycobactéries atypiques (*M.avium-intracellulare*, *M.xenopi*, *M.kansasii*, espèces à croissance rapide) est restée stable entre 2006 et 2012 (Tableau 5).

**Dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt de l'obligation vaccinale par le BCG en 2007, 12 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2012 (*M.avium*, *M.intracellulare* ...), ont été isolées d'adénites chez des enfants de moins de 5 ans. Le nombre de ces cas, qui avait nettement augmenté de 2006 à 2011, s'est stabilisé en 2012 (Tableau 6).**

**Tableau 5 : Identification des souches de mycobactéries atypiques reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2012 (classement par ordre dégressif, basé sur les chiffres de l'année 2009)**

Espèce	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>M. avium</i>	98 (25%)	85 (19%)	71 (14%)	105 (21%)	96 (22%)	116 (19%)	100 (21%)
<i>M. intracellulare</i>	66 (17%)	57 (13%)	77 (16%)	100 (20%)	82 (19%)	103 (17%)	105 (22%)
<i>M. xenopi</i>	47 (12%)	69 (15%)	66 (13%)	48 (10%)	52 (12%)	54 (9%)	49 (10%)
<i>M. gordonae</i>	20 (5%)	35 (8%)	21 (4%)	33 (7%)	20 (5%)	23 (4%)	16 (3%)
<i>M. chelonae</i>	11 (3%)	37 (8%)	41 (8%)	31 (6%)	31 (7%)	44 (7%)	40 (9%)
<i>M. kansasii</i>	27 (7%)	28 (6%)	21 (4%)	31 (6%)	24 (6%)	26 (4%)	17 (3%)
<i>M. abscessus</i>	41 (10%)	37 (8%)	44 (9%)	24 (5%)	35 (8%)	54 (9%)	44 (9%)
<i>M. bolletii</i>	1	3	5 (1%)	2	10 (2%)	10 (2%)	7
<i>M. massiliense</i>		6 (1%)	13 (3%)	15 (3%)	9 (2%)	18 (3%)	12 (3%)
<i>M. simiae</i>	12 (3%)	6 (1%)	9 (2%)	19 (4%)	7 (2%)	11 (2%)	7 (1%)
<i>M. fortuitum</i>	22 (5%)	15 (3%)	18 (4%)	18 (4%)	11 (3%)	25 (4%)	21 (4%)
<i>M. peregrinum</i>	10 (3%)	20 (4%)	32 (7%)	16 (3%)	6 (1%)	12 (2%)	9 (2%)
<i>M. interjectum</i>		4	1	6 (1%)	0	2	
<i>M. mucogenicum</i>	4 (1%)	2	6 (1%)	6 (1%)	8 (2%)	11 (2%)	2
<i>M. scrofulaceum</i>	1	3	5 (1%)	5 (1%)	4 (1%)	2	
<i>M. szulgai</i>	3	3	3	3	3	8 (1%)	6
<i>M. marinum</i>	8 (2%)	6 (1%)	10 (2%)	2	2	3	4
<i>M. arupense</i>	1	4	6 (1%)	2	2	5 (1%)	2
<i>M. genavense</i>			1	2	3	2	2
<i>M. haemophilum</i>	1			1	0	0	
<i>M. malmoense</i>	3	3	8 (2%)	1	2	6 (1%)	1
<i>M. ulcerans</i>			1		1	0	
Autres espèces	24 (6%)	32 (8%)	34 (7%)	34 (7%)	20 (5%)	56 (9%)	23
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>455</b>	<b>492</b>	<b>504</b>	<b>428</b>	<b>601</b>	<b>467</b>
<b>Responsables d'infections (N et %)**</b>	<b>250</b> 62%	<b>262</b> 58%	<b>227</b> 46%	<b>300</b> 59%	<b>308</b> 72%	<b>381</b> 62%	<b>325</b> 70%

\*\* sur la base de critères historiques, cliniques et bactériologiques (ex. recommandations de l'American Thoracic Society...).



**Tableau 6 : Evolution de 2006 à 2012 du nombre de souches de mycobactéries atypiques issues d'adénites cervicales chez des enfants âgés de moins de 5 ans**

Année	N de cas
2006	3
2007	5
2008	7
2009	9
2010	11
2011	19
2012	12

### **Identification à partir des prélèvements cliniques reçus**

**Parmi les 163 prélèvements reçus au CNR-MyRMA en 2012 :**

- 107 ont été mis en culture : 53 cultures étaient négatives, 5 contaminées et 49 positives à : *M.tuberculosis* complex (n=35), *M.xenopi* (n=2), *M.kansasii* (n=1), *M.avium* complex (n=3), *M.malmoense* (n=1), *M.marinum* (n=1), *M.chelonae* (n=3), *M.europaeum* (n=1), *M.genavense* (n=2).

- 93 ont fait l'objet d'un test d'amplification génique directe : soit par PCR Taqman spécifique de l'ADN de *M.tuberculosis* complex, soit par amplification par Taqman Real Accurate suivie de séquençage du gène *rpoB* ou d'un test Genotype CM® ou Genotype AS®. Les résultats des PCR étaient positifs :

- . pour 24 des 29 prélèvements à examen microscopique positif (84%) : *M.tuberculosis* complex (n=22), *M.malmoense* (n=1), *M.genavense* (n=1).
- . pour 4 des 34 prélèvements à examen microscopique négatif : *M.tuberculosis* complex.
- . pour 16 des 30 prélèvements (53%) pour lesquels l'examen microscopique n'avait pas pu être fait en raison d'un trop faible volume : *M.tuberculosis* complex.

- 50 ont fait l'objet d'une recherche directe de mutation responsable de la résistance à la rifampicine par étude du gène *rpoB* (séquençage ou test MTBDRplus®).

### **Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques**

#### ***Souches reçues pour tests de sensibilité***

**542 souches de mycobactéries ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques : 217 souches de *M.tuberculosis* complex** (dont 164, soit les 2/3, ont fait l'objet d'un antibiogramme de 1<sup>ère</sup> ligne et d'un antibiogramme de 2<sup>ème</sup> ligne) **et 325 souches de mycobactéries atypiques.**

#### ***Tests phénotypiques de sensibilité pour *M.tuberculosis* complex***

Les tests de sensibilité sur les **217 souches de *M.tuberculosis* complex** ont été :

- un antibiogramme « **standard** » (antituberculeux **de 1<sup>ère</sup> ligne**) pour **53 souches**, pour vérification des résultats trouvés dans les laboratoires d'origine.



- un antibiogramme « **complet** », (antituberculeux de **1ère ligne et de 2<sup>ème</sup> ligne**) a été effectué **164 fois**, sur 92 souches envoyées pour multirésistance (plusieurs de ces souches ont faits l'objet de plusieurs antibiogrammes à différents stades du traitement pour vérifier leur statut), et 67 souches envoyées pour résistance à au moins l'isoniazide ou la rifampicine ou pour suspicion de multirésistance (résistance à l'isoniazide et crainte de résistance associée à la rifampicine) ou parce que les patients présentaient des intolérances médicamenteuses. C'est pourquoi il y a eu 164 antibiogrammes de 2<sup>ème</sup> ligne pour 159 souches.

### Résistance aux antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne des 217 souches testées en 2012 (Tableau 7)

- 29% (n=62) étaient sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine (multisensibles)  
 - 71% étaient résistantes à au moins un de ces 4 antibiotiques dont 47% (n=101) étaient multirésistantes (MDR) c'est-à-dire résistantes à l'isoniazide et la rifampicine. Ce nombre est supérieur au nombre total de souches MDR reçues en 2012 (N=92) car pour certains cas de tuberculose MDR plusieurs antibiogrammes ont été faits, par exemple lorsque l'on a craint une aggravation des résistances après application d'un premier régime thérapeutique.

Entre 2007 et 2012, la proportion de souches multisensibles reçues a diminué de 52 à 29%, ce qui reflète la volonté du CNR-MyRMA de se concentrer sur l'étude des souches résistantes et d'éviter de travailler sur des souches sensibles en dehors de demandes particulières (suspicion de résistance finalement non confirmée, intolérance aux antituberculeux de première ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats...). Ce n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour tests de sensibilité que l'on peut établir des statistiques représentatives de la résistance aux antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne en France, mais à partir du travail en réseau spécifiquement organisé pour cela (réseau AZAY-mycobactéries, cf. section « Surveillance »)

**Tableau 7 : Phénotype de résistance aux antituberculeux de première ligne des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2012**

		2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>Sensible*</b>		<b>88 (52%)</b>	<b>86 (47%)</b>	<b>54 (32%)</b>	<b>59 (37%)</b>	<b>51 (30%)</b>	<b>62 (29%)</b>
<b>Résistant</b> à au moins 1 antibiotique mais non multirésistant	H	7 (4%)	12 (6%)	21 (12%)	13 (8%)	21 (12%)	20 (9%)
	S	6	9	6	7	6	7
	R	1	6	5	4	5	9
	E	-	-	1	0	0	1
	H+S	27 (16%)	17 (9%)	24 (14%)	23 (14%)	22 (13%)	14 (6%)
	H+E	-	-	2	1	0	0
	H+S+E	3	3	5	7	1	1
	R+S						1
	R+E						1
	R+S+E	-	-	1	-		-
<b>Sous-total</b>		<b>44 (26%)</b>	<b>47 (25%)</b>	<b>65 (38%)</b>	<b>56 (35%)</b>	<b>55 (33%)</b>	<b>54 (25%)</b>
<b>Multirésistant</b>	H+R	12	10	8	5	7	22 (10%)
	H+R+S	8 (5%)	20 (22%)	21 (12%)	12	16	21 (10%)
	H+R+E			3	2	6	7
	H+R+S+E	16 (9%)	18 (10%)	19 (11%)	26 (16%)	35	51 (24%)
<b>Sous-total</b>		<b>38 (22%)</b>	<b>52 (28%)</b>	<b>51 (30%)</b>	<b>45 (28%)</b>	<b>64 (37%)</b>	<b>101 (47%)</b>
<b>TOTAL GENERAL</b>		<b>170</b>	<b>185</b>	<b>170</b>	<b>160</b>	<b>170</b>	<b>217</b>

\*sensible à isoniazide (H), rifampicine (R), éthambutol (E) et streptomycine

**Résistance aux antituberculeux de seconde ligne des 159 souches testées en 2012 (164 antibiogrammes de 2<sup>e</sup> ligne faits pour ces 159 souches) (Tableaux 8 et 9)****- Résultats pour les 92 souches multirésistantes (MDR) :**

Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient les suivantes (**Tableau 8**) : streptomycine 70%, éthambutol 58%, éthionamide 62%, cyclosérine et PAS ~2/10, au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 1/4, fluoroquinolones 28%. La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **aussi** aux fluoroquinolones **et** à au moins un aminoside de réserve (définition de l'ultrarésistance ou **XDR**) était de **18%** soit **18 cas de tuberculose XDR identifiées en 2012** (cf. ci-après, **Tableau 12**).

**Tableau 8 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> ligne des souches multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2012**

Années (n souches testées)	2006 (53)	2007 (38)	2008 (51)	2009 (51)	2010 (45)	2011 (64)	2012 (92)
a Ethambutol	58	45	37	47	66	70	58
Streptomycine	75	76	76	78	75	80	70
b Amikacine	6	5	10	8	13	9	13*
Kanamycine	15	5	16	16	20	23	27*
Capréomycine	9	8	10	10	12	11	14*
c Fluoroquinolones	13	8	14	18	23	22	28
d Ethionamide	34	45	57	43	75	82	62
e PAS	15	5	6	12	9	17	17
Cyclosérine	10	11	37	20	9	18	28
Thiacétazone	42	30	26	39	52	39	62
Linezolide	0	0	0	0	0	0	1

a : antibiotiques de première ligne autres que isoniazide et rifampicine

b : aminosides autres que streptomycine (entrent dans la définition de XDR)

c : entre dans la définition de XDR

d : ou prothionamide

e : antibiotiques bactériostatiques (de « dernière ligne »)

\* au total : 65 souches sensibles aux 3 aminosides ; 10 résistantes aux 3 ; 11 monorésistantes à kanamycine ; 3 monorésistantes à capréomycine ; 2 résistantes à kanamycine-amikacine ; 1 résistante à kanamycine-capréomycine

**- Résultats pour les 67 souches reçues pour antibiogramme complet dans un contexte autre que la multirésistance**

Les proportions de souches résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient beaucoup plus basses parmi les souches reçues dans un contexte autre que la multirésistance (ex. effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine) (**tableau 9**) que parmi les souches reçues pour multirésistance, ce qui est logique : 0-1% à l'amikacine ou aux fluoroquinolones, 3% à l'éthambutol.

L'observation d'une très faible proportion de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches non MDR à ce jour est un résultat rassurant car l'utilisation large de cette famille d'antibiotique dans la communauté pour de nombreuses indications (infections urinaires, respiratoires etc...) fait craindre l'émergence de la résistance parmi les souches de *M.tuberculosis* complex sensibles aux antituberculeux de première ligne et donc à terme l'impossibilité d'utiliser cette classe pour les traitements antituberculeux de seconde ligne.



**Tableau 9 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> ligne des souches reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2012 pour antibiogramme de 2<sup>e</sup> ligne, hors multirésistance (suspicion initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1<sup>re</sup> ligne...)**

Années (n souches)	2006 (41)	2007 (35)	2008 (38)	2009 (83)	2010 (81)	2011 (75)	2012 (67)
Ethambutol	nd	6	8	10	13	13	3
Streptomycine	nd	54	42	39	43	43	28
Amikacine	0	3	0	0	3	3	0
Fluoroquinolones	0	0	5	1	0	0	1
Ethionamide	14	21	29	52	59	59	66
PAS	6	11	10	10	11	11	3
Thiacétazone	9	12	10	14	11	11	16

#### Tendances évolutives 2006-2012

Le nombre moyen de **souches MDR** reçues au CNR-MyRMA, qui était resté stable entre 2006 et 2010 **autour d'une médiane de 51 par an (Tableau 10)** soit environ une souche par semaine, avait augmenté en 2011 (69 souches pour les cas de l'année) et **a encore augmenté en 2012 (92 souches)**. Cette augmentation qui est maintenue en ce début d'année 2013 a fait l'objet d'une alerte à la DGS et l'InVS (cf. chapitre Alerte).

Le nombre de **souches « pré-XDR »** (c'est-à-dire MDR résistantes aux fluoroquinolones **ou** à un des trois aminosides de réserve) a évolué de façon significative en 2011 et 2012 : 11 en 2006, 3 en 2007, 12 en 2008, 9 en 2009, 7 en 2010 mais 17 en 2011 et **21 en 2012** (10 résistants au moins à un aminoside et 11 résistants aux quinolones).

Il faut remarquer que la proportion des souches MDR identifiées par l'enquête systématique auprès des laboratoires du réseau CNR-MyRMA et qui ont effectivement été reçues au CNR-MyRMA pour études *in vitro* a augmenté entre les périodes 2001-02 (~ 60 %) et 2008-12 (90-100 %) **(Tableau 10)**. **Le CNR-MyRMA reçoit donc maintenant la quasi-totalité des souches MDR de France.**

Le nombre de souches **XDR** qui était de **1 ou 2 par an de 2006 à 2008** (idem depuis 2002) a **augmenté à 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011 mais 17 en 2012**. La proportion de XDR parmi les MDR a augmenté de 2-3% de 2002 à 2005, 4-5% en 2006-07, 8% en 2009, 13% en 2010 et 18% en 2012.



**Tableau 10 : Evolution de 2001 à 2012 du nombre de souches MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA. Exhaustivité de l'envoi des souches MDR au CNR-MyRMA**

	Cas MDR recensés par le réseau CNR-MyRMA	Souches MDR reçues au CNR-MyRMA pour l'année	Exhaustivité envoi souches (%) pour l'année	Souches XDR reçues CNR-MyRMA	% XDR parmi MDR reçues CNR-MyRMA
<b>2001</b>	48	29	60	0	0
<b>2002</b>	79	47	59	1	2
<b>2003</b>	77	60	78	2	3
<b>2004</b>	68	51	75	1	2
<b>2005</b>	65	60	92	1	2
<b>2006</b>	60	53	88	2	4
<b>2007</b>	44	38	86	2	5
<b>2008</b>	57	51	89	2	4
<b>2009</b>	48	48	100	4	8
<b>2010</b>	47	45	96	6	13
<b>2011</b>	75	69	92	6	8
<b>2012</b>	nd	92	nd	17	18

nd : enquête en cours, donnée disponible fin 2013

Le **Tableau 10** montre la stabilité du nombre de cas de tuberculose MDR de 2006 à 2010 (moyenne 43 cas/an), l'augmentation de 50% en 2011 (69 cas) puis de 30% en 2012 (92 cas). Le nombre de cas de patients nés en France, dans les autres pays d'Europe de l'Ouest, dans les pays du Maghreb, dans les pays d'Afrique hors Maghreb et dans les pays d'Amérique sont restés stables (**Tableau 11**). On note une petite augmentation du nombre de cas nés en Asie (3-4 /an en 2006-2008, 7-10 /an en 2009-2012).

**Le fait marquant est la très forte augmentation du nombre de cas MDR nés dans les pays d'ex-URSS et d'Europe de l'Est : 7-15 /an en 2006-2010, 27 en 2011 et 50 en 2012.** Il faut noter en particulier l'augmentation du nombre de cas nés en Russie hors Tchétchénie (0-2 /an en 2006-2010, 6-7 /an en 2011-2012), en Russie-Tchétchénie (1 /an en 2007-2007, 3-5 /an en 2008-2011, 8 en 2012), en Ukraine (0-2 /an en 2006-2011, 4 en 2012) **et surtout en Géorgie (1-4 /an en 2006-2010, 5 en 2011 et 26 en 2012).**

Le **Tableau 12** montre que les patients d'ex-URSS représentaient ¼ des cas de tuberculose XDR en 2004-2008, 2/3 des cas en 2009-2011 et la totalité des cas en 2012. Ils représentaient aussi les 4/5 des cas pré-XDR.



**Tableau 11 : Distribution des pays de naissance des patients dont une souche MDR-XDR a été reçu au CNR-MyRMA de 2006 à 2012**

Pays d'origine	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
France	11	5	6	6	4	8	9
Norvège	0	0	0	1	0	0	0
Portugal	0	2	2	0	2	1	0
<b>Total Europe Ouest</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
Roumanie	2	1	5	1	0	6	3
Moldavie	1	1	1	0	1	1	1
Fédération de Russie hors Tchétchénie	2	0	1	2	1	7	6
Fédération de Russie - Tchétchénie	1	1	5	3	4	4	8
Arménie	1	1	2	3	0	4	2
Géorgie	2	1	1	4	1	5	26
Ukraine	0	2	0	0	0	0	4
Autres	0	0	0	0	1	0	0
<b>Total Europe Est et ex. URSS</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>50</b>
Algérie	1	3	2	1	1	3	1
Maroc	0	1	0	2	0	1	2
Tunisie	0	0	0	0	0	1	1
<b>Total Maghreb</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
Angola	1	1	1	1	2	1	1
Cameroun	0	2	2	0	2	0	0
Cap-Vert	0	0	0	0	1	0	0
Congo	3	1	4	4	1	0	2
Côte Ivoire	5	1	2	3	2	2	1
Djibouti	1	0	0	0	0	0	0
Egypte	0	0	0	0	0	0	1
Ethiopie	1	0	0	1	0	0	0
Ghana	0	0	0	1	0	0	0
Guinée	3	1	2	0	2	1	1
Madagascar-Comores	0	1	0	1	0	0	0
Mali	0	0	0	1	0	0	0
Mauritanie	0	0	0	1	0	1	0
Niger	0	0	1	0	0	0	0
Rep. Centrafricaine	1	1	0	0	0	1	2
RD Congo	4	5	1	0	2	5	5
Rwanda	0	0	0	0	0	1	0
Sénégal	1	0	2	1	1	0	3
Soudan	0	0	0	1	0	0	1
Tchad	0	0	0	0	1	1	1
Togo	1	0	0	0	0	0	0
<b>Total Afrique hors Maghreb</b>	<b>21</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>18</b>
Bangladesh	0	0	0	0	0	0	1
Cambodge	0	0	1	0	0	0	0
Chine	1	1	1	2	1	1	3
Corée	0	0	0	2	0	0	0
Inde	2	0	0	2	0	1	2
Mongolie	0	0	0	0	2	1	1
Népal	1	0	0	0	0	0	0
Pakistan	0	0	1	1	1	2	2
Sri Lanka	0	1	0	0	0	0	0
Syrie	0	0	0	1	0	0	0
Thaïlande	0	0	0	0	0	1	0
Tibet	0	1	0	0	3	0	0
Vietnam	0	0	1	2	2	1	0
<b>Total Asie</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>9</b>
Chili	0	0	0	1	0	0	0
Haïti	0	0	0	0	1	1	1
Pérou	1	1	0	0	1	0	0
<b>Total Amériques</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>GRAND TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>35</b>	<b>44</b>	<b>49</b>	<b>40</b>	<b>64</b>	<b>92</b>



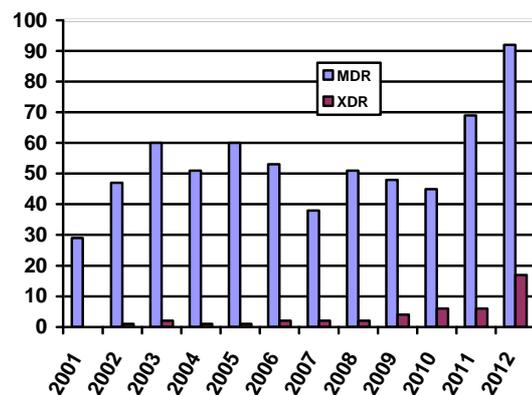
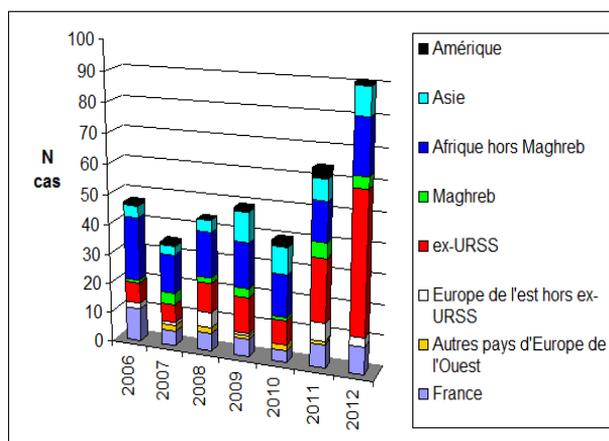
**Tableau 12 : Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyRMA de 2004 à 2012**

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique subsaharienne	Europe de l'Est et ex-URSS	Total
2004		1 (Algérie)			1
2005			1 (Mali)		1
2006	1 (France)			1 (Tchéchénie)	2
2007	1 (France)		1 (Congo)		2
2008				2 (Russie, Roumanie)	2
2009		1 (Algérie)		3 (2 Géorgie, Arménie)	4
2010	1 (Portugal)			5* (3 Tchétchénie, Géorgie*, Azerbaïdjan)	6*
2011	1 (Portugal)	2 (Algérie)	1 (Côte d'Ivoire)	2 (Russie)	6
2012				17 (15 Géorgie, 1 Arménie, 1 Ukraine)	17

\* 1 cas déjà identifié en 2009, rechute

Enfin, il faut noter que parmi les cas de patients nés en Géorgie (n=26) atteints de tuberculose MDR enregistrés en 2012, 58% (n=15) avaient une souche XDR, 27% (n=7) une souche préXDR alors que seulement 15% (n=4) avaient une souche MDR dite « simple » (sensible aux fluoroquinolones et aux aminosides de réserve).

**Les 2 figures ci-dessous montrent l'évolution de la distribution des cas MDR-XDR selon le pays de naissance (figure de gauche) et du nombre de cas MDR (dont XDR) et des cas XDR (figure de droite)**





## Tests phénotypiques de sensibilité des mycobactéries atypiques et tendances évolutives 2006-2012

**Au total 325 souches de mycobactéries atypiques ont fait l'objet de tests de sensibilité aux antibiotiques.**

***M.avium-intracellulare* complex** : parmi les 205 souches reçues en 2012, 164 (83 *M.avium* et 81 *M.intracellulare*) ont fait l'objet d'un antibiogramme dont 23 (15%) étaient résistantes à la clarithromycine (CMI > 16 mg/l en milieu 7H9). Sur la période 2006 à 2012, la proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 8%, soit 79 souches sur les 962 testées. Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement, 47/189 avaient une souche résistante soit **25% de résistance secondaire**.

***M.xenopi*** : parmi les 49 souches reçues en 2012, 34 ont fait l'objet d'un antibiogramme. Aucune n'était résistante à la clarithromycine. Seuls 6 patients avaient des antécédents de traitement. Entre 2006 et 2012, seules 2 souches de *M.xenopi* ont été trouvées résistantes à la clarithromycine parmi 248 souches testées (1%). Ces souches ont été isolées chez 2 des 37 patients ayant des antécédents de traitement (**5% de résistance secondaire**).

***M.kansasii*** : Parmi les 17 souches reçues en 2012, 9 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante à la rifampicine y compris pour les 2 patients ayant des antécédents de traitement. Entre 2006 et 2012, aucune des 146 souches reçues n'étaient résistantes à la rifampicine y compris pour les 15 patients ayant des antécédents de traitement.

**Espèces à croissance rapide** : Parmi les 20 souches de *M.chelonae* testées en 2012, 3 souches isolées chez des patients avec antécédent de traitement étaient résistantes à la clarithromycine. En revanche, la proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 30/35 pour *M.abscessus* sensu stricto, 1/7 pour *M.massiliense*, et 7/7 pour *M.bolletii* (en cohérence avec la présence naturelle d'un gène *erm* spécifique conférant une résistance inductible aux macrolides chez cette dernière espèce). Les modifications des critères de classification de ces espèces durant la période 2006-2012 rend difficile la synthèse des résultats des tests de sensibilité pour le complexe *M.abscessus* (qui comprend *M.abscessus* sensu strict, *M.bolletii* et *M.massiliense*). Les 20 souches de *M.fortuitum* testées avaient une résistance en accord avec la présence naturelle d'un gène *erm* conférant une résistance inductible aux macrolides chez cette espèce

## Détection de mutations impliquées dans la résistance

### **Souches reçues pour détection de mutations**

En 2012, ont été soumis à la détection moléculaire rapide de mutations impliquées dans la résistance :

- 284 souches de *M.tuberculosis* pour la rifampicine et l'isoniazide et/ou l'éthionamide et/ou les fluoroquinolones et/ou le pyrazinamide et/ou les aminosides et/ou l'éthambutol (a) parce que provenant de malades déjà traités pour tuberculose et/ou immunodéprimés et/ou provenant d'un pays de forte endémie de résistance ou (b) pour contrôle des résultats phénotypiques.
- 74 souches de mycobactéries atypiques pour différents antibiotiques antimycobactériens.

### **Tendances évolutives 2006-2012**

Le nombre de recherches de mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis* a augmenté de 50% entre 2006 et 2008, s'est maintenu autour de 1000 par an en 2008-2010 puis a augmenté de 76 % de 2010 à 2012 (Tableau 13). Au total, le nombre de recherches de mutants a triplé entre 2006 et 2012. Ces dernières années le diagnostic moléculaire de la résistance aux antituberculeux s'est beaucoup diversifié. Le CNR-MyRMA est passé de l'analyse de 3 gènes (*rpoB*, *gyrA* et *pncA*) permettant d'étudier la sensibilité à 3 antituberculeux (rifampicine, fluoroquinolones et pyrazinamide) à celle de 10 gènes (*rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *pncA*, *katG*,



*inhA*, *rrs*, *embB*, *ethA*, *ethR*) permettant d'étudier la sensibilité à 9 antituberculeux (rifampicine, fluoroquinolones, pyrazinamide, isoniazide, éthionamide, éthambutol, amikacine, kanamycine, capréomycine).

**Tableau 13 : Nombre de recherches de mutations dans les gènes codant pour la résistance aux antituberculeux (rifampicine, isoniazide, pyrazinamide, fluoroquinolones, éthionamide, éthambutol, amikacine, kanamycine, capréomycine) effectuées au CNR-MyRMA sur les souches de *M.tuberculosis* complexe reçues de 2006 à 2012**

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>rpoB</i> (rifampicine)	184	197	276	254	201	232	284
<i>katG-inhA</i> (isoniazide)	182	179	276	249	198	227	280
<i>pncA</i> (pyrazinamide)	142	138	172	164	137	183	217
<i>gyrA/gyrB</i> (Fluoroquinolones)	117/12	105/105	150/150	129/129	128/128	183/183	231/231
<i>ethA/ethR</i> (éthionamide)	-	-	-	-	50/50	79/79	103/103
<i>rrs</i> (aminosides)	-	-	-	-	56	99	159
<i>embB</i> (éthambutol)	-	-	-	-	62	105	159
<b>Total</b>	<b>637</b>	<b>724</b>	<b>1024</b>	<b>925</b>	<b>1010</b>	<b>1370</b>	<b>1767</b>

### **Mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis*, tendances évolutives 2006-2012**

#### **Rifampicine (RIF)**

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBR*plus*® complété par l'amplification et le séquençage du gène *rpoB* ont permis d'identifier des **mutations dans *rpoB* pour 114 des 284 (40%) souches** testées en 2012 (**Tableau 14**). Ce nombre est supérieur à celui des souches MDR reçues ( $n = 92$ ) car il comprend aussi les 10 souches monorésistantes à la rifampicine (**Tableau 7**) et quelques souches MDR testées à plusieurs reprises au cours de l'évolution du patient. La distribution des mutations étaient comme suit :

**- 76 mutations S531L (67% des mutations)**

- 38 autres mutations (33% des mutations) réparties sur les codons 526 (14%), 516 (3%) ou 513 (3%), ou d'autres codons ou combinaisons de codons ou des délétions

La **part dominante de la mutation S531L du gène *rpoB* dans la résistance à la rifampicine reste de l'ordre de 2/3 depuis 2006**, en accord avec les données publiées à l'étranger. Les souches résistantes à la rifampicine pour lesquelles aucune mutation n'est détectée dans la région étudiée du gène *rpoB* sont exceptionnelles (moins de 1%), ce qui fait de la recherche de mutations dans ce gène une excellente approche rapide de la résistance à la rifampicine et même de la multirésistance en raison de la rareté des souches monorésistantes à la rifampicine (cf. § surveillance de la résistance).



**Tableau 14 : Distribution des mutations du gène *rpoB* identifiées dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2012 pour détection moléculaire de la résistance à la rifampicine (techniques : GenoType®MTB-DRplus, séquençage du gène *rpoB*)**

Mutation dans RpoB	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
S531L	26	29	34	41	37	58	76
H526Y	2	2	5	7	4	6	3
H526D	3	3	2	5	4	6	6
H526N ou T ou L ou S ou R ou C	5	2		2	2	4	7
D516V	9	1	3	8	1	1	2
D516Y	4			2		3	2
Délétion N519				1		2	
L511P				1	3**		
Q513P						1	2
Q513K							1
Q513E							1
L521V							1
S531W	1			3		2	1
S531F						1	1
L533P	3			2	3	2	1
S509T + S522W						1	
L511P + D516G						1	3
L511P + M515V							1
S509T + D516Y						1	
Q510H + H526R						1	
L511R + D516Y						3	
S512I + H526N							1
L511P + 1546-1547insT(516)							1
Délétion sur 515-516						1	
Délétion à partir codon 523							1
Insertion entre 531 et 532				6			
Mutation entre 510 et 533*		1	14	2			
Mutation entre 516 et 522°							3
<b>Total avec mutation</b>	<b>53</b>	<b>38</b>	<b>58</b>	<b>80</b>	<b>54</b>	<b>94</b>	<b>114</b>
Pas de mutation	131	159	218	174	147	138	161
PCR négatives + ininterprétables <sup>a</sup>							9
<b>Total général</b>	<b>184</b>	<b>197</b>	<b>276</b>	<b>254</b>	<b>201</b>	<b>232</b>	<b>284</b>

\* position de la mutation non précisée

\*\* dont 1 avec en plus mutation S509I

° correspond au patient avec mutation L521V

<sup>a</sup> nouvelle rubrique, non citée jusqu'en 2011



## Isoniazide (INH)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBR*plus*, complété par le séquençage des gènes *katG*, *inhA* et du promoteur d'*inhA*, a permis d'identifier des **mutations dans *katG* et *inhA* pour 132 des 280 (47%) souches testées en 2012 (Tableau 15)** :

-111 mutations en 315 dans *katG* (84%), toujours corrélée avec une résistance phénotypique à haut niveau à INH, dont 102 mutations isolées et 9 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA*. **La mutation S315T isolée est la plus fréquente (n=101, 77%)**

- 22 fois, une mutation de type « -15 c->t » dans la région régulatrice du gène *inhA* (17%), corrélée, lorsqu'elle est isolée (n=13, 10%), avec une résistance phénotypique à bas niveau à INH.

**La part dominante de la mutation isolée S315T dans le gène *katG* reste de l'ordre de 2/3 depuis 2006**, en accord avec les données publiées à l'étranger. **Les mutations isolées de type « -15 c->t » dans la région régulatrice du gène *inhA* représentent environ 10% des cas. Les souches pour lesquelles on n'a pas détecté de mutation ni dans *katG* ni dans *inhA* et sa région régulatrice représentent 10 à 15 % de l'ensemble des souches résistantes à l'isoniazide testées selon les années.**

**Tableau 15 : Distribution des mutations des gènes *katG* et *inhA* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2012 pour détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide (techniques : GenoType®MTB-DR*plus* et séquençage des gènes *katG*, *inhA* et promoteur du gène *inhA*)**

Mutation	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
KatG S315T	73*	58*	54	73	49	76	101
KatG 315 autre que S>T	1*	2*	1	2	-	3	1
KatG autre que S315	7	6	9	14	7	12	10°
Promoteur <i>inhA</i>	12	27	17	28	24	21	13
<i>dont -15</i>	12	27	16	28	24	20	13°
<i>InhA</i>	2	1		2	1**	2	
KatG S315T <b>et</b> promoteur <i>inhA</i>	nd*	nd*	12	9	8	10	9
Autre combinaison KatG <b>et</b> <i>InhA</i>				1			
<b>Total mutations</b>	<b>95</b>	<b>94</b>	<b>93</b>	<b>129</b>	<b>89</b>	<b>124</b>	<b>132</b>
Pas de mutation	87	85	183	120	109	103	140
PCR négatives + ininterp. <sup>a</sup>							8
<b>Total général</b>	<b>182</b>	<b>179</b>	<b>276</b>	<b>249</b>	<b>198</b>	<b>227</b>	<b>280</b>

\* en 2006 et 2007, les mutations dans *InhA* n'ont pas été recherchées dans les souches mutantes dans *KatG*, en conséquence, il n'a pas été précisé si ces souches sont des simples mutants *KatG* ou des doubles mutants *KatG* + *InhA*

\*\* en plus mutation *inhA* -15 c->t

° dont 2 souches avec *KatG* A110V

<sup>a</sup> nouvelle rubrique, non citée jusqu'en 2011



## Pyrazinamide (PZA)

Le séquençage du gène *pncA* qui code pour la pyrazinamidase, enzyme qui transforme le PZA, prodrogue inactive, en acide pyrazinoïque, antibiotique actif, a été effectué **pour 217 souches en 2012** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).

Parmi 217 souches, 58 (27%) avaient une mutation du gène *pncA* (**Tableau 16**) dont 6 *M.bovis* (résistance naturelle par « mutation » H57D). Il faut noter la très grande diversité des mutations identifiées dans PncA, tant en nature qu'en position sur la protéine, diversité qui rend difficile l'interprétation de l'effet des mutations sur la résistance. Cette très grande diversité des mutations rend aussi très difficile de dresser un tableau évolutif sur plusieurs années car un tel tableau serait trop long.

## Fluoroquinolones (FQ)

Le système d'amplification-hybridation GenoType® MTBRsI, complété par le séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour l'ADN gyrase, cible des fluoroquinolones, a été effectué **pour 231 souches reçues en 2012** (souches MDR, souches suspectes d'être MDR, par exemple, après rechute).

Des **mutations (Tableau 17)** ont été détectées chez **35 des 231 souches** (13%) dans **GyrA** (27 cas) ou **GyrB** (5 cas dont une double mutation GyrA et GyrB) : 28 souches MDR résistantes aux quinolones dont 17 XDR et 11 pré-XDR, 1 souche non MDR résistante aux quinolones, 1 souche MDR phénotypiquement sensible aux quinolones mais avec une proportion déjà anormale de mutants R aux quinolones (dont la mutation a été identifiée par génétique), et 3 souches sensibles aux quinolones mais qui portent un polymorphisme de *gyrA* ou *gyrB* ne conférant pas la résistance.

Les codons dominant dans GyrA étaient les codons 94 (n=17, 55%) et 90 (n=7, 19%).

## Autres antituberculeux : ethionamide (ETH), aminosides (KAN, AMK, CAP), ethambutol (EMB)

### **Ethionamide**

Le séquençage des gènes *ethA* et *ethR*, codant pour la monooxygénase EthA et son régulateur EthR, a été effectué **pour 103 souches en 2012**. Des mutations (**Tableau 18**) ont été détectées chez 51 souches (50%). On note une grande diversité des mutations dans EthA et de rares mutations dans EthR ou la région intergénique.

### **Kanamycine, amikacine et capreomycine :**

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBRsI® a été utilisé pour la recherche de mutations dans le gène *rrs* aux positions 1401, 1402 et 1484, ces 3 positions étant impliquées dans la résistance aux aminosides de seconde ligne (kanamycine et amikacine) et à la capréomycine. Au total, **159 souches ont été étudiées en 2012**. Les résultats montrent la présence d'une **mutation** a1401g pour 10 d'entre elles (6%), dont 9 sont MDR et la dernière non MDR mais résistante à kanamycine et amikacine. Comme attendu, aucune des 11 souches MDR monorésistantes kanamycine ne porte de mutation RRS.

### **Ethambutol :**

Le système d'amplification-hybridation GenoType® MTBRsI a également été utilisé pour la recherche de mutations dans le gène *embB* à la position 306 qui a été associée à la résistance à l'ethambutol. Au total, **159 souches ont été étudiées en 2012**, montrant la présence d'une **mutation** du codon EmbB-306 pour **44 d'entre elles** (28%) : M306V (n= 27) et M306I (n= 17).



Tableau 16 : Distribution des mutations du gène *pncA* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA en 2012 pour détection moléculaire de la résistance au pyrazinamide (technique : séquençage du gène *pncA*)

Mutation	N 2012
L4W	1
I6L	1
V7A	1
V9A	1
V9G	1
Q10H	1
G17C	1
D49G	1
H57D*	6
F58L	2
H71R	2
L85R	1
L85P	1
T87M	2
Y95STOP	1
K96Q	2
G97C	1
Y103STOP	1
S104R	2
G108R	1
L116R	2
G132D	1
V139M	2
A146T	1
A146V	1
L159R	3
T167I	4
M175V	1
Délétion dans <i>pncA</i> :	8
532-553 del	1
395-413 del	1
405 del c	1
335 de la	1
223 del g	1
405 del c	1
347 del t	2
Insertion dans <i>pncA</i> :	5
443-444 ins cg	1
233-234 ins g	1
391-392 ins g	3
<b>Total mutations</b>	<b>58</b>
<b>PCR négatives</b>	<b>3</b>
Pas de mutation	156
<b>Total général</b>	<b>217</b>

\*mutation observée chez toutes les souches de *M. bovis*



Tableau 17 : Distribution des mutations des gènes *gyrA* et *gyrB* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA de 2006 à 2012 pour détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones (technique : séquençage)

Gène	Mutation*	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
<b><i>gyrA</i></b>	T80A**		2	2	3	5	3	1	
	G88C		1						
	D89N					1			
	A90V	2	1	2	2	3	3	7	
	S91P				2	1	3		
	D94A			3		3	3	7	
	D94H			1	1		2		
	D94G	4***		3	1	2	1	8	
	D94N	1			2		1	4	
	D94Y				1	1	3		
	Q101E				1				
	T80A** + A90G	3							
	T80A** + A90E		1						
	A90V + D94Y				1				
	A90V + D94V						3		
	A90V + D94H							2	
	<b><i>gyrB</i></b>	S470I					1		
		P478A**			1				1
		R485H		1					
S486Y					1		1		
D500A				1					
D500N						1			
A506G					1				
N538D					1			1	
N538K								1	
E540V					1		3		
E540A						1			
E540D								1	
A543V					1	1			
A547V					1				
G551R					1				
G559A**		2				2	1		
R485C + A543V							1		
<b><i>gyrA</i> + <i>gyrB</i></b>	D94A + A543V							1	
<b>Total mutations</b>		<b>10</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	
Pas de mutation PCR négatives <sup>a</sup>		107	97	137	108	108	155	194	
<b>Total général</b>		<b>117</b>	<b>105</b>	<b>150</b>	<b>129</b>	<b>128</b>	<b>183</b>	<b>231</b>	

\* numérotation *M.tuberculosis*\*\* polymorphisme sans lien avec la résistance aux quinolones\*\*\* dont 2 avec aussi la double mutation T80A + A90E

<sup>a</sup> nouvelle rubrique, non citée jusqu'en 2011



Tableau 18 : Distribution des mutations des gènes *ethA* et *ethR* dans les souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA en 2012 pour détection moléculaire de la résistance à l'ethionamide (technique : séquençage)

Gène	EthA	EthR	2012
<b><i>ethA</i></b>	G11D		1
	H22P		1
	G42V + P334A		1
	F66L + G199D		1
	G78D + wt		1
	R99G		1
	Y140STOP		2
	Y147STOP		1
	Q165P		4
	W167G		2
	Q206STOP		1
	S208STOP		1
	V238G		1
	R261W		1
	Q269STOP		2
	I305N		1
	G385D		2
	C403R		1
	Q449R		1
	R483T		1
	110 delA		5
	505-511 del + I337V		1
	703 del T		1
	1222 del T		2
	1242 del T		3
	1470 del G		1
	382-383 ins G		2
	777-778 ins C		1
	851-852 ins C		2
	1061-1062 ins C		1
	<b><i>ethR</i></b>	T149A	
<b>Zone intergénique</b>	-68 A->G		3
	-66-65 ins CG		1
<b><i>ethA et ethR</i></b>			0
<b>Total mutations</b>			<b>51</b>
Pas de mutation			49
PCR négatives <sup>a</sup>			3
<b>Total général</b>			<b>103</b>

\*Numérotation de *E.coli*

<sup>a</sup> nouvelle rubrique, non citée jusqu'en 2011



### **Mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries atypiques**

En 2012, 74 souches ont été soumises à la détection moléculaire rapide de la résistance :

- 68 à la clarithromycine par recherche de mutations de la région autour des nucléotides 2058 et 2059 du gène *rrl* codant l'ARN 23S. Huit de ces souches (12%) portaient une mutation : 2058 A>G (*M.intracellulare* n= 2 ; *M.abscessus* n=2), 2058 A>T (*M.avium*, n=1), 2059 A>C (*M.chelonae*, n= 1), 2059 A>G (*M. chelonae*, n= 1), 2068 G>A (*M. abscessus*, n=1). Toutes ces souches étaient résistantes à la clarithromycine.

- 6 souches aux aminosides par recherche de mutation au niveau de la position 1408 du gène *rrs* codant l'ARNr16S. L'analyse a porté sur des souches de *M. abscessus* (n= 4), *M. bolletii* (n=1), *M. chelonae* (n= 1). 3 de ces 6 souches (*M.abscessus*) portaient une mutation A1497G de l'ARNr16S. Ces souches mutées étaient résistantes aux aminosides à un haut niveau et deux avaient été isolées de patients ayant des antécédents de traitement par aminosides.

### **Prélèvements pour diagnostic de la lèpre et détection de mutations impliquées dans la résistance aux antilépreux**

En 2012, nous avons reçu 51 prélèvements pour diagnostic de lèpre (**Tableau 19**). Pour 24 prélèvements (47%), l'examen microscopique était positif. Ces prélèvements positifs correspondaient à 24 patients : 20 nouveaux cas et 4 rechutes, prélevés 11 fois chez des patients de Mayotte (11 nouveaux cas), 3 fois chez des patients de Nouvelle Calédonie (2 nouveau cas, 1 rechute), 2 fois de Tahiti (2 rechutes) et 8 cas vus en consultation ou hospitalisés en France métropolitaine (3 cas à Paris-Tenon, 2 cas à Paris-Saint Louis, 1 cas à Caen, 1 cas à Toulouse, 1 cas à Montpellier) mais immigrants de pays où la lèpre est encore présente : Inde (1), Haïti (1), Congo (4), Comores (2).

Les tests moléculaires de résistance (amplification-séquençage des gènes *rpoB*, *folP* et *gyrA*) effectués sur 22 biopsies cutanées ont été positifs pour 19 cas. Pour 3 biopsies, les amplifications étaient négatives du fait du faible nombre de bacilles ou chez des patients sous traitement.

#### **Les résultats de détection moléculaire de résistance ont été les suivants :**

- pour les nouveaux cas (recherche de résistance « primaire »), les 20 souches ont été considérées comme sensibles (pas de mutation) à la rifampicine, aux sulfones et aux quinolones,  
- pour les cas de rechute, la souche était sensible aux antilépreux (pas de résistance « secondaire »), sauf pour un cas de Nouvelle Calédonie pour lequel la souche était résistante à la dapsons (mutation T53I dans *folP*).

En 2012, nous avons eu 4 résultats positifs de culture in vivo (multiplication chez la souris) pour les prélèvements reçus en 2011.

#### **Tendance évolutive 2006-2012**

Le nombre de prélèvements pour suspicion de lèpre chez des patients vus en France (métropole ou DOM-TOM) reçus au CNR-MyRMA a beaucoup augmenté durant les 7 dernières années : 10 par an en 2006-07, 20 en moyenne en 2008-10, 51 en 2011 et en 2012. Le nombre de cas confirmés a augmenté d'une moyenne de 3 à 7 entre 2006 et 2010 à 22 en 2011 et 24 en 2012. Au total, 6 des 66 cas positifs testés durant les 7 années étaient résistants aux sulfamides (dapsons) (9% de résistance), 1 aux quinolones et 1 à la rifampicine (**Tableau 18**).



Tableau 19 : récapitulatif 2006-2011 des prélèvements reçus au CNR-MyRMA pour diagnostic de lèpre

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>N total reçus</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>25</b>	<b>51</b>	<b>51</b>
<b>N prélèvements positifs pour <i>M.leprae</i> :</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>24</b>
Nouveau cas	4	0	5	5	6	9	20
Rechutes	1	2	2	1	1	13	4
<b>Lieu du diagnostic :</b>							
France Métropolitaine	0	0	2	2	4	10	8
DOM-TOM	5	2	5	4	3	12	16
<b>Pays d'origine des patients :</b>							
DOM-TOM	5	2	5	2	5	14	16
Afrique			1	2	1	8	4
Asie-Océan Indien			1		1		3
Amérique							1
Europe				2			
<b>Resistance aux antiléprieux :</b>							
Dapsone	1/4	0/2	1/4	1/6	1/7	1/19	1/19
Rifampicine	0/5	0/2	0/4	0/6	0/7	1/19	0/19
Ofloxacine	0/3	0/2	0/3	1/6	0/7	0/19	0/19



### 3. Activités de surveillance

#### 3.1. Activités de surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux anti-tuberculeux

##### Surveillance de la résistance primaire et secondaire à travers le réseau Azay-mycobactérie, tendances évolutives depuis 1995

Les données recueillies en 2012 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2011 par les 37 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries. Ces 37 laboratoires ont colligé en 2011 les données concernant 1581 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2011. Un test de sensibilité à au moins rifampicine et isoniazide a été réalisé pour 1566 des 1581 (99%) cas colligés. La distribution des cas par région est donnée dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M.tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie de 2006 à 2011 : distribution régionale des cas à culture positive. Pour 2011, les données sont exprimées en nombre de cas et en % du total des cas de l'année.

Régions	2006	2007	2008	2009	2010	2011	
						N	%
Alsace	41	35	40	50	39	55	3,5
Aquitaine	144	116	106	126	132	141	8,9
Auvergne	0	29	23	29	18	21	1,3
Bourgogne	15	23	29	24	17	22	1,4
Bretagne	16	14	22	17	12	15	0,9
Centre	21	18	24	15	12	32	2,0
Champagne Ardennes	19	6	16	15	13	13	0,8
Corse	0	0	0	0	0	0	0
Franche-Comté	16	16	17	12	11	10	0,6
Ile de France	702	712	712	780	747	773	48,9
Languedoc-Roussillon	67	57	53	31	42	45	2,9
Limousin	16	13	23	14	14	22	1,4
Lorraine	25	28	36	28	23	33	2,1
Midi-Pyrénées	49	91	57	55	0	0	0
Nord-Pas de Calais	47	35	35	44	42	51	3,2
Normandie Basse	34	25	34	34	31	31	1,9
Normandie Haute	49	41	40	36	39	19	1,2
Provence ACA	0	37	39	38	61	44	2,8
Pays de Loire	69	74	79	63	71	85	5,4
Picardie	28	24	26	22	20	28	1,9
Poitou-Charentes	16	16	18	23	17	18	1,1
Rhône-Alpes	135	139	141	117	126	123	7,8
<b>TOTAL</b>	<b>1509</b>	<b>1549</b>	<b>3578</b>	<b>1574</b>	<b>1487</b>	<b>1581</b>	<b>100</b>



Pour les 1566 cas pour lesquels la sensibilité à rifampicine et isoniazide a été éprouvée, les renseignements sur les antécédents de traitement ont permis de stratifier les données selon les recommandations de l'OMS (Tableau 21).

### Caractéristiques générales des cas de tuberculose recensés

La proportion des cas de tuberculose à culture positive étudiés par le réseau Azay-mycobactéries en 2011 en fonction des **antécédents de traitement (7,0% déjà traités), du pays de naissance (61% nés à l'étranger) et du statut VIH (7,2%)** est présentée dans la Figure 3.

L'analyse de l'évolution depuis 1995 montre :

- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de la **proportion des cas diagnostiqués chez des patients ayant des antécédents de traitement** ce qui est en faveur d'une prise en charge convenable de la tuberculose en France (indicateur de qualité),
- une **augmentation de la proportion des cas diagnostiqués chez des patients nés à l'étranger**, de 35% environ au milieu des années 1990 à plus de 50% depuis 2002 et 61% en 2011. La plupart des pays d'Europe de l'Ouest (cf rapports OMS) constatent une évolution de ce type,
- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de la **proportion des cas diagnostiqués chez les patients VIH+** autour de 7-10 %, ce qui montre que la co-infection tuberculose-VIH est peu fréquente en France et que l'impact de l'épidémie du VIH sur l'épidémiologie de la tuberculose est modeste.

**Tableau 21 : Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2011 parmi les nouveaux cas de tuberculose (résistance "primaire") et les cas déjà traités (résistance "secondaire") selon le pays de naissance (France/autres pays). Réseau Azay-Mycobactéries**

Sensibilité	Nouveaux cas						Malades déjà traités					
	Total		France		Autres		Total		France		Autres	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Testées</b>	1231	100	432	100	764	100	110	100	33	100	7	100
<b>Sensible</b>	1104	89,7	412	95,4	659	86,3	92	83,6	28	84,8	6	82,4
<b>Résistant</b>	127	10,3	20	4,6	105	13,7	18	16,4	5	15,2	1	17,6
<b>- dont résistant au moins à :</b>												
SM	90	7,3	17	3,9	72	9,4	13	11,8	4	12,1	9	12,2
INH	83	6,7	11	2,5	70	9,2	12	10,9	2	6,1	1	13,5
RMP	25	2,0	0	0	24	3,1	10	9,1	2	6,1	8	10,8
EMB	18	1,5	0	0	17	2,2	5	4,5	1	3,0	4	5,4
<b>- dont monorésistant à :</b>												
SM	41	3,3	9	2,1	32	4,2	5	4,5	2	6,1	3	4,5
INH	29	2,4	3	0,7	26	3,4	2	1,8	0	0	2	2,7
RMP	1	0,1	0	0	1	0,1	1	0,9	1	3,0	0	0
EMB	2	0,2	0	0	2	0,3	0	0	0	0	0	0
<b>- dont MDR</b>	24	1,9	0	0	23	3,0	9	8,2	1	3,0	8	10,8

SM : streptomycine ; INH : isoniazide ; RMP : rifampicine ; EMB : éthambutol  
 Pour 15 souches, les antibiogrammes n'ont pas été réalisés  
 Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 228 cas  
 Le pays de naissance était inconnu pour 77 cas  
 La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 12 cas

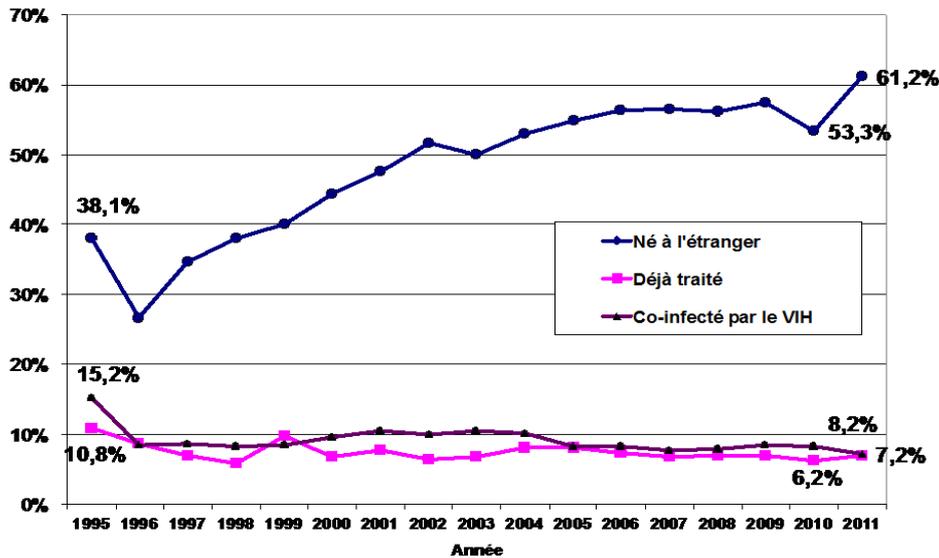


Figure 3 : Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2011

**Pourcentage global de résistance « primaire »**

Chez l'ensemble des 1187 malades sans antécédent de traitement (nouveaux cas), le pourcentage de résistance ("résistance primaire") à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne était en 2011 de 10,3% (Tableau 21, Figure 4). Ce chiffre est en très légère augmentation depuis 1995. Pour les détails et la publication afférente, cf. le rapport 2012.

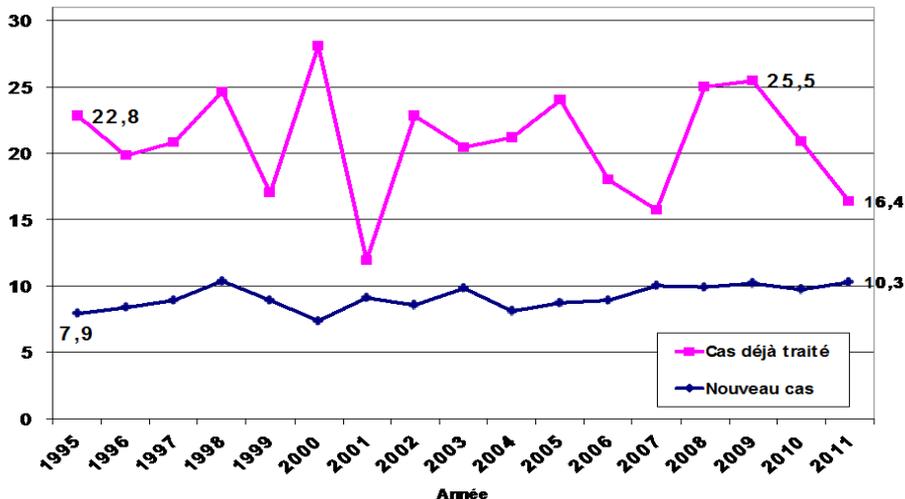


Figure 4 : Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance primaire) et les cas déjà traités (résistance secondaire). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2011



Le pourcentage de résistance primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (Figure 5, Tableau 21) était beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 6,7%) et la streptomycine (SM 7,3%) que pour la rifampicine (RMP 2,0%) et l'éthambutol (EMB, 1,5%). **Le pourcentage de résistance primaire à l'INH en 2011 est légèrement supérieur à celui de 2009 (6,1%) et 2010 (5,4%),** et est significativement plus élevé qu'au début de la surveillance (3,7% en 1995). Pour les détails et la publication afférente, cf. le rapport 2012. **Ceci confirme l'importance de maintenir en France les recommandations thérapeutiques de quadrithérapie pour les nouveaux cas.**

Comme les années précédentes, la quasi-totalité des souches résistantes à la rifampicine rapportées en 2011 chez les patients sans antécédent de traitement (24/25) étaient aussi résistantes à INH (multirésistance). La proportion de cas **multirésistants « primaires »** mesuré en 2011 au travers du réseau Azay-mycobactéries (1,9%) est près du double de celui de 2010 (1,1%) et 2009 (1,0%). Une légère augmentation des cas MDR « 1<sup>aires</sup> » avait été notée en 2011.

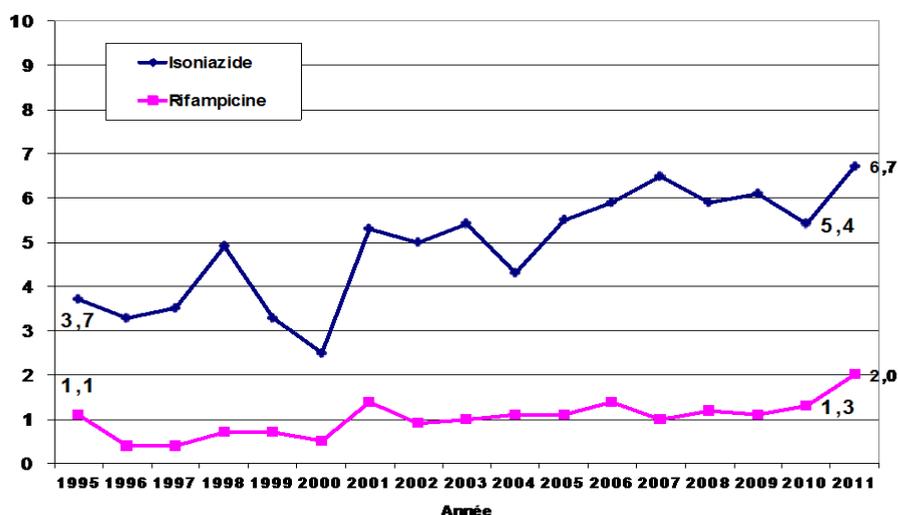


Figure 5 : Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2011

### Résistance primaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance primaire à au moins un antituberculeux chez les 432 malades nés en France (Tableau 21) était de 4,6% alors qu'il était de 13,7% chez les 764 nés à l'étranger ( $p < 0,01$ ). **Les pourcentages de résistance primaire étaient plus élevés chez les 764 nés à l'étranger que chez ceux nés en France** pour INH (9,2% vs 2,5% ;  $p = 0,07$ ) et RMP (3,1% vs 0% ;  $p = 0,001$ ). Comme les autres années, **la totalité (n=23) des cas multirésistants « primaires »** pour lesquels le pays de naissance était connu **concernaient des malades nés à l'étranger.**

### Pourcentage global de résistance « secondaire »

Chez les 110 malades ayant déjà reçu un traitement antituberculeux (cas déjà traités), le pourcentage de résistance (résistance "secondaire" ou "acquise") à au moins un des 4 antituberculeux était de 16,4%, soit 1,5 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas (Figure 4, Tableau 21). Ce pourcentage est parmi les plus bas observé depuis le début de la surveillance en 1995 mais les fluctuations enregistrées en limitent l'interprétation. Le pourcentage de résistance "secondaire" à INH observé en 2011 (10,9%) est aussi parmi les plus bas depuis 1995 (Figure 7). En revanche, le pourcentage de résistance secondaire à RMP (9,1%) reste élevé et proche de celui qui avait été observé en 2010 (8,8%).

Une souche était mono-résistante à RMP (sensible à INH) et les 9 autres souches résistantes à la RMP chez les patients avec antécédent de traitement étaient aussi résistantes à INH (multi résistance).



### Résistance secondaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance "secondaire" à au moins un antituberculeux était de 15,2% chez les 33 malades nés en France (Tableau 21) et de 17,6% chez les 74 malades nés à l'étranger. A l'exception de SM, le pourcentage de résistance 2aire était plus élevé chez les malades nés à l'étranger pour chaque antituberculeux mais les différences n'étaient pas significatives ( $p=0,26$ ) en raison du faible nombre de cas dans chaque catégorie. **Huit des 9 cas de multirésistance secondaire concernaient des malades nés à l'étranger.**

### Monorésistance à la rifampicine

En 2011, une seule souche était monorésistante à RMP chez les nouveaux cas (résistance « primaire ») et une souche chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »).

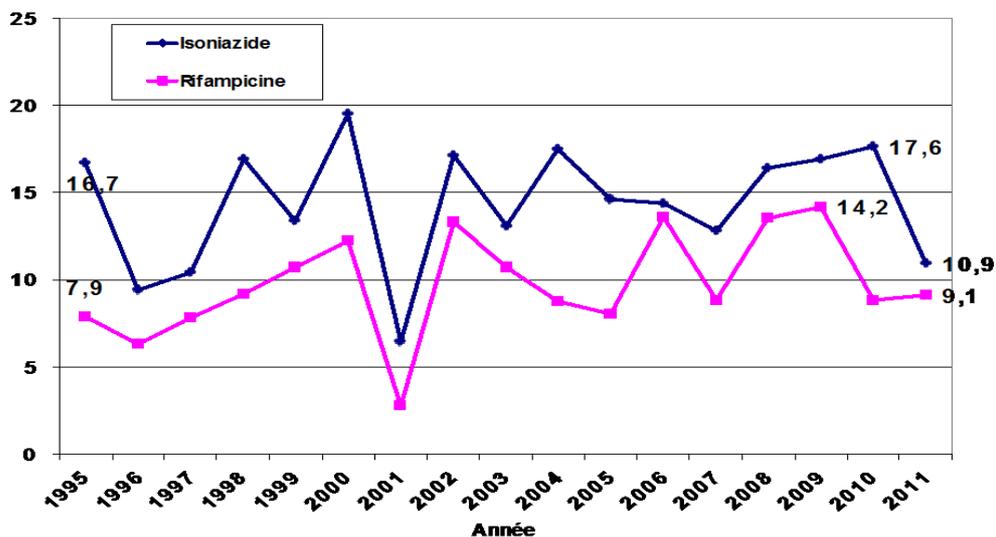


Figure 7 : Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2011

## Surveillance exhaustive de la tuberculose à bacilles multirésistants à travers le réseau CNR-MyRMA

En 2012, le CNR-MyRMA a recueilli, à travers son réseau d'environ 860 laboratoires, des données concernant les cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2011. Comme chaque année, les données ne sont pas tout à fait complètes au moment de rédiger le rapport d'activité (92% de réponse au questionnaire). Les données colligées à ce jour **concernent 4427 cas de tuberculose à culture positive.**

**La région Ile-de-France a diagnostiqué près de la moitié des cas documentés de 2011 (44%) et la région Rhône-Alpes 12%.** Chacune des autres régions représentent de 0,2 % (Corse) à 6% (Provence-Côte d'azur) du total des cas.

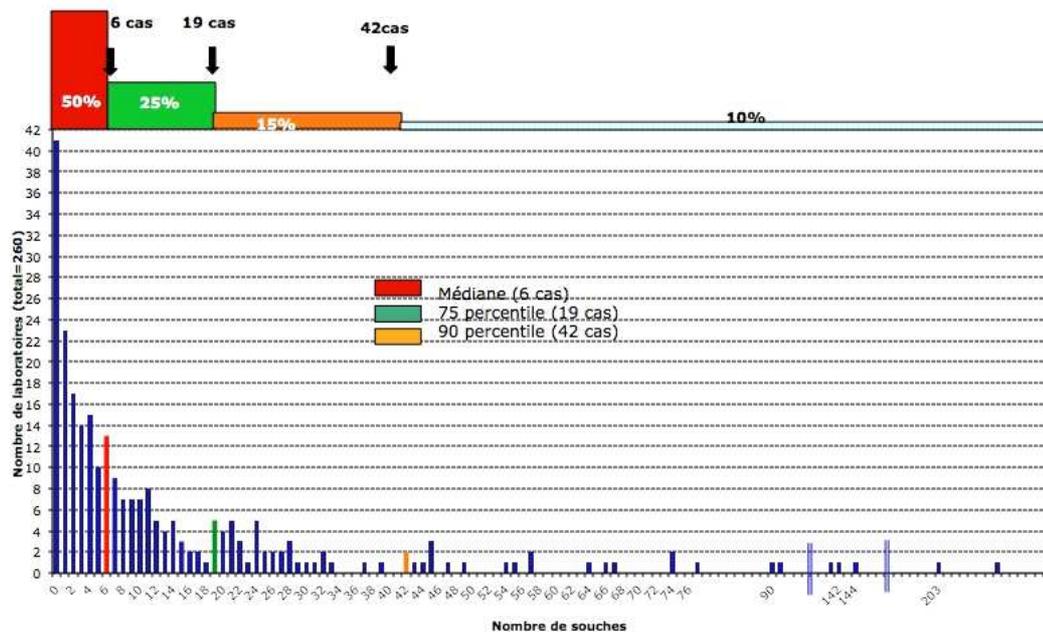
Comme les années précédentes, **un peu plus de la moitié des cas (52%) de tuberculose documentés en 2011 était concentrée dans les 23 laboratoires dont l'activité est la plus importante (Figure 8):**

- 17 laboratoires de CHU (7 d'Ile de France et 10 d'autres régions), deux ne participant pas au réseau AZAY-Mycobactéries



- 3 hôpitaux généraux d'Ile-de-France
- 2 gros laboratoires privés
- 1 Institut Pasteur (Guyane)

Malgré la place prépondérante de gros laboratoires, un petit nombre de cas MDR sont identifiés chaque année dans des laboratoires diagnostiquant peu de cas de tuberculose (**Figure 9**) ce qui justifie le gros travail d'exhaustivité mené par le CNR-MyRMA pour intégrer dans le réseau tous les laboratoires du territoire national qui pratiquent la mycobactériologie.



**Figure 8 : Distribution des laboratoires du réseau du CNR-MyRMA en fonction du nombre de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2011**

### **Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants**

Le nombre de **cas de tuberculose à bacilles multirésistants** diagnostiqués en France par les 304 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour était de **75 en 2011**, ce qui représente une proportion de **1,7 ± 0,4%** des 4427 cas colligés (**Tableau 22**).

Parmi ces 75 cas MDR, 5 (6,7%) concernaient des patients déjà identifiés les années précédentes (cas à rechutes) et 70 des patients identifiés pour la 1<sup>ère</sup> fois en 2011, dont 69 en métropole et 1 dans les DOM.

Le pourcentage de cas MDR (1,7%) calculé sur les 4427 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par l'ensemble des laboratoires français qui pratiquent la mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) est significativement ( $p=0,04$ ) inférieur à celui calculé sur les 1566 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les 37 laboratoires universitaires du réseau Azay-Mycobactéries (2,4% en cumulant les cas de résistance 1aire, 2aire et les cas avec antécédents inconnus ou douteux). Cette différence peut être expliquée par le caractère spécialisé des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU.

Comme chaque année, quelques laboratoires du réseau CNR-MyRMA n'ont pas encore adressé les données 2011 malgré de nombreuses relances ; toutefois, il est peu probable que le nombre total de cas multirésistants diagnostiqués en France en 2011 augmente avec les réponses de ces derniers laboratoires car tous les cas correspondants aux souches MDR reçues par le CNR-MyRMA pour confirmation et antibiogramme complémentaire (cf. plus haut « activités d'expertise ») ont déjà été inclus dans l'analyse. La proportion définitive des cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2011 pourrait en



revanche être très légèrement inférieure à 1,7% après intégration au dénominateur (total des cas de tuberculose à culture positive) des données des derniers laboratoires qui ne concerneront très probablement que des cas de tuberculose non MDR.

Calculée pour chacune des régions de France (**Tableau 22**), la proportion de cas multirésistants rapportée au total des cas de tuberculose bactériologiquement prouvés était en 2011 comprise entre 0 et 3,4%.

**Tableau 22 : Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2011 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA**

Région	Total cas	Cas MDR	
		N	%
Alsace	96	3	3,1
Aquitaine	201	0	0
Auvergne	33	0	0
Bourgogne	50	1	2,0
Bretagne	138	2	1,4
Centre	100	1	1,0
Champagne Ardennes	36	0	0
Corse	8	0	0
Franche-Comté	42	0	0
Ile de France	1954	36	1,8
Languedoc-Roussillon	93	2	2,2
Limousin	40	0	0
Lorraine	83	1	1,2
Midi-Pyrénées	94	0	0
Nord-Pas de Calais	155	1	0,6
Normandie Basse	59	1	1,7
Normandie Haute	51	1	2,0
Provence ACA	265	9	3,4
Pays de Loire	126	2	1,6
Picardie	71	0	0
Poitou-Charentes	46	0	0
Rhône-Alpes	541	14	2,6
Départements d'outre-mer	145	1	0,7
<b>Total</b>	<b>4427</b>	<b>75</b>	<b>1,7</b>

### **Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants**

**Les caractéristiques des 69 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2011 en métropole sont les suivantes :**

- 67% sont des hommes
- Six (9,7%) sont nés en France, et 56 (81,2%) à l'étranger, et pour 7 cas, le pays de naissance est inconnu
- parmi ceux nés à l'étranger, 12 sont nés en Afrique sub-saharienne, 3 au Maghreb, 15 en Europe de l'Est, 7 en Asie, et 3 en Europe de l'ouest
- l'âge moyen est de 32,5 ans (1 cas de 1,3 ans et un de 5,8 ans, 29% de 15 à 24 ans et 27% de 25 à 34 ans),
- 10% sont séropositifs pour le VIH, 58% sont séronégatifs et 32% de statut VIH inconnu
- 85% des cas ont une atteinte pulmonaire de leur tuberculose,

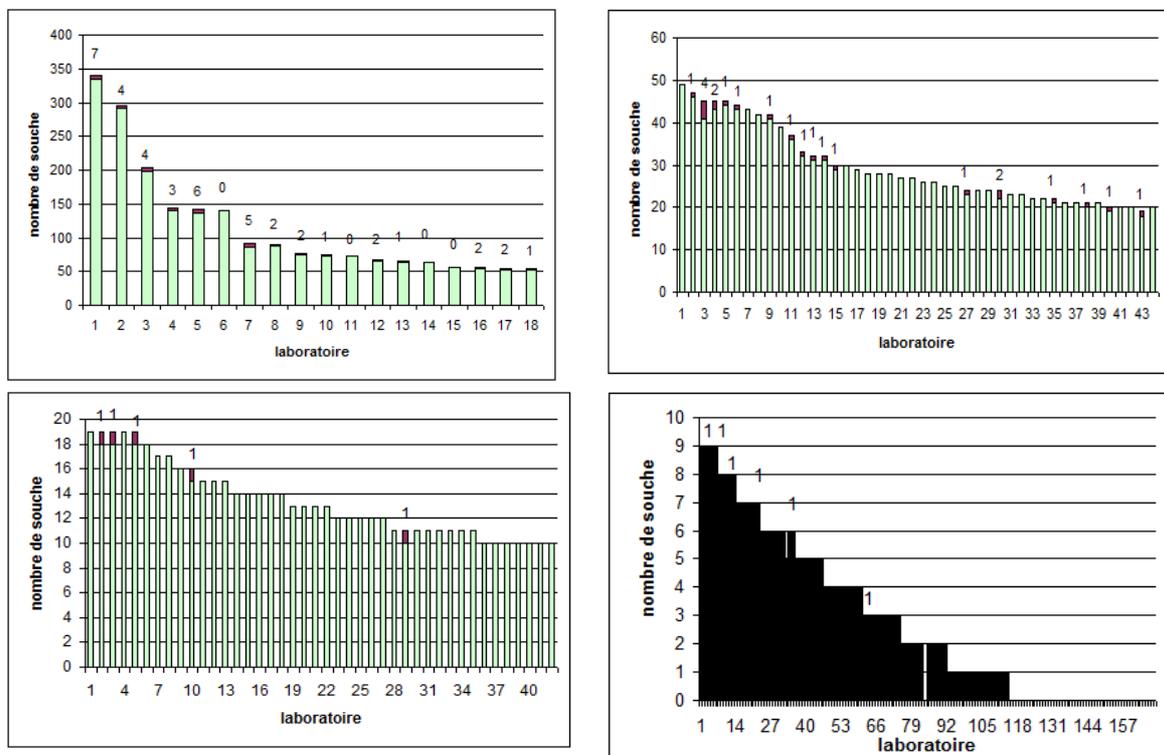


- 51% n'ont jamais été traités (MDR « primaire »),
- 48% des cas ont été pris en charge en Ile-de-France, dont 19 % à Paris.

### Laboratoires ayant identifié les cas de tuberculose MDR de 2011

La **Figure 9** montre que les cas de tuberculose à bacilles multirésistants identifiés en 2011 sont dispersés dans de très nombreux laboratoires (au plus 7 cas MDR dans un même laboratoire), même dans des laboratoires qui diagnostiquent peu de cas de tuberculose, ce qui impose d'inclure tous les laboratoires qui pratiquent la mycobactériologie pour pouvoir assurer une surveillance exhaustive des cas MDR.

En effet, les 18 laboratoires qui ont diagnostiqué au moins 50 cas de tuberculose en 2011 (total=2095 cas, 47 % des cas de l'année) ont identifié 42 cas MDR (56 % des cas de l'année). Vingt-deux MDR ont été diagnostiqués dans les 44 laboratoires ayant diagnostiqué entre 20 et 49 cas de tuberculose et 11 cas MDR ont été identifiés par les 198 laboratoires ayant diagnostiqué moins de 20 cas, dont 6 par les 156 laboratoires ayant diagnostiqué moins de 10 cas.



**Figure 9 : Distribution des cas de tuberculose MDR diagnostiqués en 2011 selon le nombre total de cas de tuberculose diagnostiqués dans les laboratoires.**

de haut en bas : les 18 laboratoires ayant diagnostiqué 50 cas (totalisent 42 cas MDR), les 44 laboratoires ayant diagnostiqué de 20 à 49 cas (totalisent 22 cas MDR), les 42 laboratoires ayant diagnostiqué de 10 à 19 cas (totalisent 5 cas MDR) et les 156 laboratoires ayant diagnostiqué <10 cas (totalisent 6 cas MDR)

En abscisse : les laboratoires classés par ordre décroissant de nombre total de cas de tuberculose diagnostiqués. En ordonnée : nombre total de cas de tuberculose diagnostiqué. Les chiffres au-dessus des colonnes et les parties des colonnes colorées en rouge indiquent le nombre de cas MDR diagnostiqués dans le laboratoire.



### Tendances évolutives 1992-2011

Le pourcentage de cas multirésistants de 2011 est bien supérieur à celui de 2010 et de 2009 et est le plus élevé parmi ceux observés depuis le début de la surveillance en 1992. Durant les 19 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau 23), le pourcentage de cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en France est passé de 0,4-0,7% entre 1993 et 1998 à 0,9% en 1999-2001 et entre 1,1 et 1,4 % depuis 2002 et finalement 1,7% en 2011.

Tableau 23 : Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2011)

Année	Cas MDR	Total cas	% MDR	[IC95]
1992	48	8441	0,6	[0,4-0,7]
1993	40	8539	0,5	[0,3-0,6]
1994	58	7751	0,7	[0,5-0,9]
1995	40	7119	0,6	[0,4-0,8]
1996	29	6441	0,5	[0,3-0,6]
1997	26	5917	0,4	[0,3-0,6]
1998	39	5766	0,7	[0,5-0,9]
1999	48	5597	0,9	[0,6-1,1]
2000	51	5569	0,9	[0,7-1,2]
2001	48	5445	0,9	[0,7-1,2]
2002	79	5609	1,4	[1,1-1,7]
2003	77	5480	1,4	[1,1-1,8]
2004	68	5333	1,3	[1,0-1,6]
2005	65	5043	1,3	[1,0-1,6]
2006	61	4933	1,2	[0,9-1,5]
2007	44	4802	0,9	[0,7-1,2]
2008	57	4880	1,2	[0,9-1,5]
2009	48	4503	1,1	[0,8-1,4]
2010	47	4388	1,1	[0,8-1,4]
2011*	75	4427	1,7	[1,3-2,1]

\*chiffre à affiner (quelques réponses de laboratoires sont en attente)

La distribution régionale des cas MDR identifiés par le CNR-MyRMA est restée remarquablement constante durant les années 2006-2011 (Tableau 24) pour la majorité des régions. Les deux exceptions importantes sont la région **Rhône Alpes** pour laquelle le nombre annuel de cas est passé **de 5-6 entre 2006-2010 à 14 en 2011**, et la région **Provence-Côte d'azur** pour laquelle le nombre annuel de cas est passé **de 1-4 entre 2006-2010 à 9 en 2011**. En Ile-de-France, le nombre annuel de cas qui était autour de 30 avant 2011 est passé à 36 en 2011. L'Ile-de-France cumule 55% du total des cas MDR enregistrés de 2006 à 2011. La proportion de cas MDR diagnostiqués en dehors de l'Ile-de-France était de 52% en 2011, 51% en 2010 mais 38% en 2009 (Figure 9).



**Tableau 24 : Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2006 à 2011 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA**

Région	2006	2007	2008	2009	2010	2011	TOTAL	% total
Alsace	2	0	2	1	2	3	10	3,0
Aquitaine	3	0	1	1	1	0	6	1,8
Auvergne	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Bourgogne	0	0	0	0	1	1	2	0,6
Bretagne	1	1	2	3	0	2	9	2,7
Centre	0	0	1	0	0	1	2	0,6
Cham. Ardennes	1	0	0	0	0	0	1	0,3
Corse	0	0	3	2	1	0	6	1,8
Franche-Comté	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Ile de France	35	28	31	30	23	36	183	55,3
Languedoc-Roussillon	0	1	2	0	2	2	7	2,1
Limousin	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Lorraine	2	2	0	0	0	1	5	1,5
Midi-Pyrénées	0	1	0	1	0	0	2	0,6
Nord-Pas de Calais	2	1	1	1	1	1	7	2,1
Normandie Basse	0	1	0	0	3	1	5	1,5
Normandie Haute	2	3	0	0	1	1	7	2,1
Provence ACA	4	1	2	1	4	9	21	6,3
Pays de Loire	2	0	2	2	0	2	8	2,4
Picardie	0	0	1	0	1	0	2	0,6
Poitou-Charentes	1	0	1	1	0	0	3	0,9
Rhône-Alpes	3	5	7	5	5	14	39	11,8
Dép. d'outre-mer	2	0	1	0	2	1	6	1,8
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>44</b>	<b>57</b>	<b>48</b>	<b>47</b>	<b>75</b>	<b>331</b>	<b>100</b>

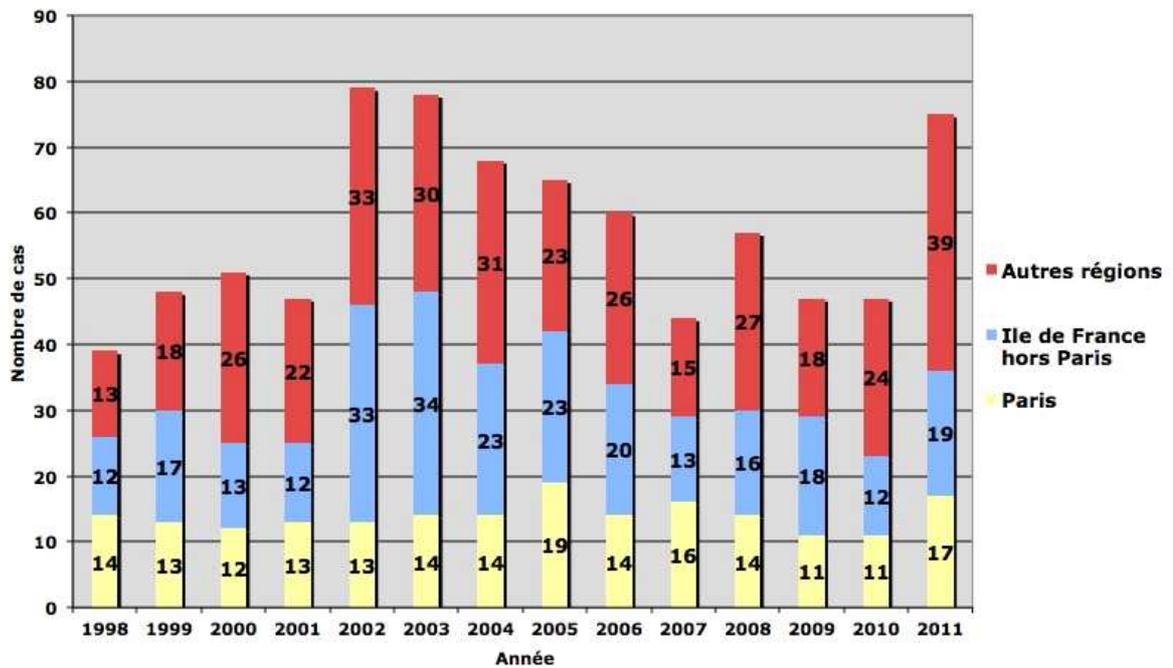


Figure 10 : Evolution de la distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants selon la région du laboratoire signalant le cas : Paris, Ile de France, autres régions, 1998-2011

Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont beaucoup modifiées durant les 19 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau 25). Il faut noter une **diminution** constante des proportions représentées par les **hommes** (74 à 57%), par **les patients avec antécédents de traitement** (72 à 32%), par les **patients séropositifs pour le VIH** (19 à 11%) et par les **patients nés en France** (48 à 10%). **L'augmentation de la proportion de patients nés à l'étranger (de 52 à 84%) concerne ceux nés en Europe (Europe de l'est et ex-URSS) et en Afrique sub-saharienne.**

**Tableau 25 : Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 2006 à 2010**

Caractéristiques	Période			
	1992-1995	1996-2000	2001-2005	2006-2010
N total de cas recensés, dont :	186	192	339	257
- déjà connus CNR-MyRMA*	35 (19%)	38 (20%)	42 (12%)	22 (8%)
- recensés pour la 1 <sup>ère</sup> fois	151 (81%)	154 (80%)	297 (87%)	237 (91%)
<b>Parmi les cas signalés pour la 1<sup>ère</sup> fois :</b>				
Age médian	39 (16-87)	37 (18-88)	31 (1-95)	32 (1-92)
Sexe masculin	74%	65%	61%	57%
Antécédents de traitement	72%	55%	39%	32%
Atteinte pulmonaire	92%	94%	90%	86%
Séropositif pour le VIH	19%	19%	17%	11%
Né à l'étranger, dont :	52%	62%	79%	84%
- Europe	3%	10%	13%	34%
- Maghreb	15%	17%	17%	10%
- Afrique sub-saharienne	20%	23%	35%	41%
- Autres	14%	12%	14%	15%
Examen microscopique (+)	56%	63%	62%	52%
Résistance à l'éthambutol	34%	30%	32%	46%
Résistance à la streptomycine	55%	56%	63%	71%

\* aucune information n'a pu être recueillie pour certains malades

### **Surveillance de la méningite tuberculeuse à travers le réseau CNR-MyRMA, tendances évolutives**

Parce que l'incidence des cas de méningite tuberculeuse (MTB) chez les enfants de 5 ans et moins constitue un des indicateurs proposés par l'International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) pour juger de l'impact de la politique de vaccination par le BCG, il a été décidé de recueillir cet indicateur chaque année depuis 2000.

Pour cela, le CNR-MyRMA a entrepris une **enquête rétrospective concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants de  $\leq 5$  ans** à travers son réseau.

Les données recueillies par le réseau du CNR-MyRMA ont ensuite été croisées avec celles recueillies par l'InVS dans le cadre de la **notification obligatoire (DO) de la tuberculose pour permettre une analyse de capture-recapture**. En raison de l'anonymisation des données de la notification obligatoire au moment de la constitution du fichier de l'InVS, nous avons dû revenir à la fiche d'information initiale recueillie par les Agences régionales de Santé (ARS, ex-DDASS). L'accord de la CNIL a été obtenu en 2010 pour avoir l'accord de lever l'anonymat et finalement croiser les informations de ces deux sources.

De 2000 à 2011, 26 cas de MTB chez les enfants de 5 ans et moins ont été signalés dans le cadre de la DO, mais seuls 9 ont été retenus dans l'enquête. Les autres cas ont été exclus en raison d'une culture négative du LCR (n=10), de la perte des dossiers (n=4), d'une déclaration en double, d'un cas diagnostiqué en 1999, et d'une méningite virale.

Pendant la même période, le CNR-MyRMA a enregistré 14 cas de MTB chez des enfants de 5 ans et moins, mais seuls 10 ont été retenus. Parmi les 4 exclus, il y avait 2 adultes, un cas à culture négative du LCR et un cas dont l'ensemble du dossier était introuvable.

Au total, 8 cas communs ont été enregistrés dans les deux systèmes, un uniquement dans le cadre de la DO, et



deux uniquement au CNR-MyRMA. En conséquence, 11 cas de MTB à culture positive ont été identifiés par les 2 systèmes.

Le **Tableau 26** donne la distribution des cas à culture positive selon les années et il **ne semble pas y avoir de tendance à la hausse du nombre de cas** en particulier après 2007, année de modification de la politique vaccinale.

**Tableau 26 : Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants de 5 ans et moins de 2000 à 2011**

Année	Nombre de cas à culture positive	Taux d'incidence pour 10 millions d'habitants	Nombre total de cas enregistrés dans la DO	Nombre total de cas enregistrés au CNR-MyRMA
2000	1	0.017	3	1
2001	1	0.016	4	1
2002	1	0.017	1	2
2003	1	0.017	3	0
2004	0	0	2	1
2005	1	0.016	3	2
2006	2	0.032	4	2
2007	1	0.016	1	1
2008	1	0.016	2	2
2009	1	0.015	1	1
2010	1	0.015	0	1
2011	0	0	2	0
<b>Total</b>	<b>11</b>		<b>26</b>	<b>14</b>

### 3.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens, de la tuberculose

Les données réunies par le réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance primaire et secondaire du bacille tuberculeux sont envoyées à l'ECDC et, par ce biais, à l'OMS grâce à la collaboration ECDC-OMS région Europe. Ces données sont intégrées aux rapports de l'OMS.

Depuis 2008, le CNR-MyRMA utilise en routine la technique MIRU-VNTR 24 loci pour le génotypage de *M.tuberculosis*. En 2009, nous avons donc pu intégrer le groupe de travail Européen MIRU-VNTR et participer à la mise en place du projet « Molecular surveillance of MDR/XDR-TB in Europe », conjointement coordonné par le European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) et le National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas).

Dans le cadre de ce programme, le CNR-MyRMA a participé aux contrôles de qualité européen de génotypage MIRU-VNTR (cf. supra).



### 3.3. Etude génotypique des souches de *M.tuberculosis* : détection et investigation des cas groupés

En 2012, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser, en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain, le génotypage (empreintes digitales génomiques) de 161 souches de *M.tuberculosis* non MDR et 91 souches MDR, **soit au total 253 souches**.

Le contexte épidémiologique des demandes de génotypage de *M.tuberculosis* complexe peut être regroupé de la manière suivante :

- suspicions de tuberculose nosocomiale ou de transmission dans des familles ou des collectivités, pour lesquelles le génotypage complète l'enquête épidémiologique « autour d'un cas » réalisée par les DDASS et les Services de lutte antituberculeuse (SLAT),
- suspicions de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- suspicions de contamination de laboratoire,
- études systématiques des souches des cas de tuberculose à bacilles multirésistants, étude qui permet de participer au programme Euro-TB.

#### **Complément bactériologique des enquêtes épidémiologiques « autour d'un cas »**

En 2012, 102 souches ont été génotypées dans cette indication (**Tableaux 28 et 29**)

##### **27 situations de suspicion de transmission en collectivité** (91 cas) :

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas dans 21 situations (total 64 cas). Les 21 situations comportaient chacune de 2 à 10 cas bactériologiquement reliés :

- 4 fois au sein de familles (de 2 à 4 cas liés)
- 1 fois au sein d'une école (10 cas liés)
- 3 fois au sein de 2 foyers de travailleurs migrants (2 à 3 cas liés)
- 12 fois dans un contexte amical ou de travail (2 à 6 cas liés)
- 1 fois en milieu carcéral (2 cas liés).

##### **4 situations de suspicion de transmission nosocomiale** (11 cas) :

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas pour 3 situations (total 6 cas), avec à chaque fois 2 cas liés :

- 2 cas liés dans une situation de transmission patient/soignant à l'hôpital de Creil
- 2 fois 2 cas liés dans une situation de transmission patient/patient à l'hôpital de Niort et dans une maison de retraite à Brest.

L'analyse phylogénique a permis de montrer que les clades (ou lignées ou phylums) en cause étaient essentiellement « nt », Haarlem et Cameroun, tous appartenant à la super famille Euro-américaine. **Aucun cas non MDR reliés bactériologiquement n'appartenait au clade Beijing.**



**Tableau 28 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR- MyrMA en 2012, classés selon le contexte épidémiologique, hors MDR**

Contexte	Lieu	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement	Clade
Entreprise	Mantes La Jolie (Peugeot)	4	2	Cameroon
Famille	Paris	2	2	« nt »
Famille+ communauté	Caen	6	4	LAM
	Strasbourg	5	3	Haarlem
	Outreau	4	3	« nt »
Ecole - famille	Maisons-Alfort	10	10	S
Communauté (amis)	Caen	2	2	Haarlem
	Poitiers	2	2	« nt »
	Rennes	2	2	« nt »
	Strasbourg	2	2	Delhi/CAS
	Chaumont	5	5	Haarlem
	Corbeil-Essonnes	3	3	Haarlem
	Clichy	2	2	« nt »
	Strasbourg	2	2	« nt »
	Caen	3	3	« nt »
	Toulouse	3	2	« nt »
	Villetaneuse	8	6	Delhi/CAS
	Clichy-sous-Bois	4	0	
	Strasbourg	2	0	
	Caen	2	0	
	Rennes	2	0	
	Romorantin	2	0	
	Rennes	3	0	
Milieu carcéral	Fleury Mérogis	4	2	« nt »
Foyer travailleurs migrants	Paris	3	3	« nt »
	Paris	2	2	Haarlem
	Paris	2	2	Uganda
Patient/soignant	M. retraite Brest	2	2	« nt »
	Niort	3	2	Cameroon
Patient/patient	Creil	2	2	Cameroon
	Paris (Necker)	4	0	
<b>Total</b>		<b>102</b>	<b>70</b>	



**Tableau 29 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques en collectivité et en milieu de soin : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2012 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage).**

	<b>Collectivités et familles</b>	<b>Milieu de soin</b>
<b>2006</b>	11 enquêtes (total : 28 cas suspects) 7 épisodes confirmés : total 17 cas, 2 à 4 cas/épisode	6 enquêtes (total : 23 cas suspects) 3 épisodes confirmés : total 6 cas, 2 cas/épisode
<b>2007</b>	19 enquêtes (total : 50 cas suspects) 6 épisodes confirmés : total 23 cas, 2 à 5 cas/épisode	3 enquêtes (total : 9 cas suspects) 1 épisode confirmé : total 2 cas
<b>2008</b>	24 enquêtes (total : 65 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 45 cas, 2 à 10 cas/épisode	7 enquêtes (total : 21 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 13 cas, 2 à 7 cas/épisode
<b>2009</b>	12 enquêtes (total : 36 cas suspects) 12 épisodes confirmés : total 34 cas, 2 à 6 cas/épisode	6 enquêtes (total : 19 cas suspects) 5 épisodes confirmés : total 12 cas, 2 à 4 cas/épisode
<b>2010</b>	19 enquêtes (total : 44 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 35 cas, 2 à 5 cas/épisode	7 enquêtes (total 15 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 9 cas, 2 à 3 cas/épisode
<b>2011</b>	22 enquêtes (total : 65 cas suspects) 17 épisodes confirmés : total 44 cas, 2 à 5 cas/épisode	4 enquêtes (total 13 cas suspects) 2 épisodes confirmés : total 4 cas, 2 cas/épisode
<b>2012</b>	27 enquêtes (total : 91 cas suspects) 21 épisodes confirmés : Total 64 cas, 2 à 10 cas/épisode	4 enquêtes (total 11 cas suspects) 3 épisodes confirmés : Total 6 cas, 2 cas/épisode

### **Suspensions de rechute**

En 2012, le CNR-MyRMA a reçu les souches (souche ancienne et souche récente) de 8 patients suspects de rechute de tuberculose pour génotypage. Dans 2 cas la rechute a été confirmée (souches identiques).

### **Suspension de contamination de laboratoire**

Nous avons reçu 45 souches correspondant à 18 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. Pour 13 de ces épisodes, le génotypage a confirmé la contamination de laboratoire (souches non distinguables), totalisaient 28 souches, par groupes de 2 à 3 souches.



**Tableau 30 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* dans le cadre des suspicions de rechutes de tuberculose et de suspicions de contaminations de laboratoire : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2012**

	<b>Suspicion de rechutes</b>	<b>Suspicion de contamination de laboratoire</b>
<b>2006</b>	2 suspicions 0 confirmation	25 enquêtes (total : 78 souches) 19 épisodes confirmés : total 48 cas, 2 à 4 cas /épisode
<b>2007</b>	1 suspicion 1 confirmation	12 enquêtes (total : 28 souches) 8 épisodes confirmés : total 18 cas, 2 à 3 cas/épisode
<b>2008</b>	3 suspicions 3 confirmations	11 enquêtes (total : 28 souches) 8 épisodes confirmés : total 17 cas, 2 à 3 cas/épisode
<b>2009</b>	5 suspicions 5 confirmations	21 enquêtes (total : 59 souches) 13 épisodes confirmés : total 36 cas 2 à 6 cas/épisode
<b>2010</b>	0 suspicion	8 enquêtes (total : 40 souches) 5 épisodes confirmés : total 33 cas, 2 à 8 cas/épisode
<b>2011</b>	3 suspicions 3 confirmations	15 enquêtes (total : 40 souches) 9 épisodes confirmés : total 25 cas 2 à 5 cas/épisode
<b>2012</b>	8 suspicions 2 confirmations	18 enquêtes (total : 45 souches) 13 épisodes confirmés : Total 28 cas, 2 à 3 cas/épisode

## **Souches multirésistantes (MDR) et ultrarésistantes (XDR)**

Nous avons en 2012 analysé 91 souches MDR reçues au CNR-MyRMA fin 2011 et 2012 par la technique du MIRU-VNTR 24 loci (les souches de la fin 2012 ont été génotypées en 2013 et ne font pas partie de l'analyse qui suit). Cette technique permet à la fois une analyse phylogénique (identification des clades ou lignées ou phylums) et l'identification de cas potentiellement reliés (empreintes digitales génomique).

Sur la plan phylogénique (**tableau 31**), on voit qu'entre 2006 et 2012, la proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing est passé de 19 à 42 %, augmentation contrebalancée par une diminution des souches des lignées Haarlem, Ural et T. Ceci est bien sûr à mettre en relation avec l'augmentation de la part des cas MDR chez des patients nés en ex-URSS.

Sur le plan des empreintes digitales génomique, l'analyse des résultats révèle l'existence de **10 clusters de souches pour un total de 42 souches (46%) partageant des codes MIRU 24 identiques**. La majorité de ces souches (n=25, 59%) sont rattachés à la lignée Beijing (en 3 groupes de souches : 10, 5, 10). Les autres clusters sont rattachés aux lignées LAM (2 souches), Delhi/CAS (2 souches), « nt » rattaché à H37Rv (2 souches), « nt » rattaché à X (2 souches).

La technique MIRU24 n'étant pas très discriminante au sein de la lignée Beijing, le regroupement de souches en cluster doit être analysé avec prudence avant de conclure à un lien bactériologique, et bien sûr encore plus avant de conclure avec un lien épidémiologique. Chaque cluster a donc été analysé en tenant compte des caractéristiques des souches (phénotype et génotype de résistance) et de caractéristiques des patients (pays de naissance, ville où le diagnostic a été fait, liens familiaux).



### **Clusters rattachés à la lignée Beijing**

#### 1 cluster de 10 souches dont

- 6 souches MDR isolées de patients originaires de Géorgie (n=2), Tchétchénie (n=2) et Russie (n=2)
- 4 souches XDR isolées de patients originaires de Géorgie (n=3) et Arménie (n=1).

Ces souches sont différentes par leurs phénotypes et génotypes de résistance, **sauf pour 2 patients d'une même famille (frères)** pour lesquels il n'y a qu'une discordance pour les aminosides (une mutation mutée dans le gène *rrs* et résistante aux 3 aminosides de réserve, l'autre non mutée dans *rrs* et sensible aux 3 aminosides) qui peut correspondre à une évolution de la souche entre les 2 patients. Ces 2 patients sont récemment arrivés en France et la transmission récente a très probablement eu lieu avant leur arrivée.

#### 1 cluster de 5 souches dont

- 2 souches MDR isolées de patients originaires de Géorgie et d'Ukraine
- 3 souches XDR isolées de patients originaires de Géorgie (n=2) et d'Ukraine

Ces souches diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance.

#### 1 cluster avec 10 souches dont

- 8 souches MDR isolées de patients originaires de Géorgie (n=3), de Tchétchénie (n=3), de Russie (n=1) et du Maroc (n=1)

- 2 souches XDR (isolées de patients originaires de Géorgie)

Ces souches diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance

### **Clusters rattachés à la lignée Delhi/CAS**

#### 1 cluster avec 2 souches MDR

Ces patients originaires de l'Inde et du Pakistan sont tous les deux pris en charge dans le Val d'Oise, au CH de Gonesse (résidence d'un des 2 patients : Sarcelles). Les souches Ces souches partagent le même phénotype et génotype de résistance (légère différence non significative concernant l'éthionamide. Les liens épidémiologiques entre ces 2 patients nés dans le sous-continent indien ne sont pas éclaircis.

### **Cluster de souches dites « nt » proches de la la lignée H37Rv**

#### 1 cluster de 2 souches MDR

Ces souches partagent le même phénotype et génotype de résistance et proviennent de **patientes d'une même famille (mère et fille) nées en France.**

### **Cluster de souches dites « nt » proches de la la lignée X**

#### 1 cluster de 2 souches MDR

Ces souches partagent le même phénotype et génotype de résistance mais il n'y pas de notion de contact entre les 2 patients nés **en France et au Congo**. Ces 2 souches ressemblent beaucoup à un clone de génotype de résistance rare (KatG A110V et EthA Q269STOP) dont nous avons reçues plusieurs souches au CNR-MyRMA ces années passées, isolées chez des patients nés au Congo et en Angola et qui semblent circuler dans ces pays.

### **Clusters de souches rattachées à la lignée LAM**

#### 1 cluster de 2 souches XDR isolées de patients originaires de Géorgie.

Ces souches partagent le même génotype de résistance (petites différences de phénotype concernant la streptomycine, l'éthambutol et l'éthionamide) et proviennent de **patients d'une même famille (oncle et neveu)**. Ces 2 patients sont récemment arrivés en France et la transmission récente a très probablement eu lieu avant leur arrivée.

#### 1 cluster de 3 souches isolées de patients originaires de Géorgie (n=2) et de Tchétchénie, dont

- 2 souches MDR
- 1 souche XDR

Ces souches diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance

#### 1 cluster de 2 souches MDR isolées de patients originaires de Géorgie et d'Ukraine

Il s'agit de 2 souches MDR « simples » (avec les classiques mutations KatG et *rpoB*, et non mutées pour le reste des gènes, ce qui est peu discriminant...). Les souches diffèrent par leur phénotype de résistance à l'éthionamide,



la thiacétazone, la cyclosérine et l'éthambutol. Il n'y a pas de notion de contact entre ces 2 patients.

1 cluster de 4 souches MDR isolées de patients originaires de la région du Congo

Ces souches partagent le même génotype de résistance comprenant des mutations rares : ethA Q165P, et pncA T167I. **Les liens épidémiologiques entre les 4 patients sont établis : famille (mère et fille) et université française.**

**Au total (tableau 32), l'analyse détaillée des 10 clusters totalisant 42 souches MDR-XDR partageant des codes MIRU 24 identiques a permis de confirmer un lien bactériologique et épidémiologique pour 4 grappes de 2 ou 4 cas, totalisant 10 cas MDR-XDR (et d'éliminer un lien pour les autres cas) :**

- 2 frères nés en Géorgie : souches MDR-XDR de lignée Beijing
- mère et fille nées en France : souches MDR de lignée dites « nt » proches de la lignée H37Rv
- oncle et neveu nés en Géorgie : souches XDR de lignée LAM
- 4 personnes (mère et fille et contacts dans une même université française) nés dans la région du Congo : souches MDR de lignée LAM

**Tableau 31 : Evolution de 2006 à 2012 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignées appartenant à la superfamille East African Indian, et en bleu à la superfamille Euro-American)**

Lignée	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
<b>Groupe PGG1</b>								
EAI	2	1	0	0	0	0		3
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	3	4	8
Beijing	11	9	15	17	19	23	38	132
West African 2	1	1	0	0	0	0	1	3
West African 1	0	0	0	0	0	1		1
Canettii	1	0	0	0	0	0		1
<b>Groupe PGG2</b>								
Haarlem	5	0	2	2	2	3	2	16
LAM	5	7	3	3	4	8	16	46
URAL	4	0	2	1	0	1	2	10
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	0		2
Cameroon	2	2	3	1	3	1	3	15
Ghana (T1)	4	1	5	6	2	3	1	22
T1-T2-T3 et « nt »	19	14	18	19	12	19	21	122
<b>Divers</b>								
S	2	2	3	1	3	3	3	17
NEW-1	0	0	0	0	0	1		1
Bovis	0	0	0	0	0	1		1
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>37</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>45</b>	<b>67</b>	<b>91</b>	<b>394</b>



Le **Tableau 32** résume les cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement parmi les souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2012, identifiés grâce au génotypage systématique.

**Tableau 32 : Résultats du génotypage systématique des souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011 : cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement**

	<b>N</b>	<b>Cas reliés*(contexte, pays de naissance)</b>
<b>2006</b>	53	1 épisode de 2 cas (famille, Roumanie)
<b>2007</b>	38	1 épisode de 4 cas (famille + voisins, Portugal) 1 épisode de 2 cas (famille, Cameroun)
<b>2008</b>	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)**
<b>2009</b>	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Côte d'Ivoire)
<b>2010</b>	45	1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Tibet) 1 épisode de 2 cas (famille, Mongolie) 1 épisode de 2 cas (famille, Viet-nam)
<b>2011</b>	67	1 épisode de 3 cas (famille, Arménie) 1 épisode de 2 cas (malade vers soignant, France) 1 épisode de 3 cas (famille, Algérie) 1 épisode de 2 cas possible (famille, Roumanie) 1 épisode de 2 cas possibles (contact occasionnel, France)
<b>2012</b>		1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie) 1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie) 1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie) 1 épisode de 4 cas (famille Congo et université française)

\* sur la base des empreintes digitales génomiques (méthodes : RFLP ou MIRU 24 loci, mutations conférant la résistance).

\*\* en fait, 1 même épisode de 5 cas (famille et milieu de travail clos et étroit) étalés, sur 3 ans.



## 4. Alertes

### 4.1. Alertes et enquêtes 2012 sur des cas de tuberculose

- Avis sur la conduite-a-tenir suite à un cas de tuberculose chez un hémodialysé à Niort (janvier 2012).
- Conférence téléphonique DGS sur un cas de tuberculose chez un adolescent Val-de-Marne (juin 2012)
- Cas groupés de tuberculose à bacilles sensibles, identifiés à Marseille comme causés par une même souche de clade Beijing dans un lycée professionnel liés à des cours de conduite en milieu confiné donnés par un enseignant bacillifère (automne 2012). Le CNR-MyRMA n'a pas reçu les souches.
- Alertes adressées en octobre et novembre 2012 à la Direction Générale de la Santé (Dr Thierry Comolet) et à l'InVS (Didier Che, Delphine Antoine) concernant l'augmentation alarmante du nombre de cas de tuberculose MDR et XDR, en particulier chez des patients nés dans les pays de l'ex-URSS (Géorgie, Ukraine...) insistant sur la surcharge de travail pour le CNR-MyRMA et le « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile» et bien sûr aussi pour les structures de soins particulièrement impliquées par la prise en charge de ces patients (Centre Bligny...).
- Cette alerte a été suivie d'un rapport d'étape écrit adressé, début 2013, adressé aux mêmes acteurs et aussi à l'ARS d'Ile de France.
- Le CNR-MyRMA a participé avec l'InVS et l'ARS Ile de France à une réunion organisée en décembre 2012 par le Cabinet de la Ministre de la Santé sur l'augmentation des cas MDR-XDR.

### 4.2. Alertes et enquêtes 2012 sur des cas d'infection à mycobactérie atypique

Signalement à l'InVS (à JM Thiolet car infections nosocomiales) :

- d'un cas d'infection cutanée à *M. fortuitum* après lifting (Tours, mars 2012)
- d'un cas de spondylodiscite à *M. xenopi* apparemment sans antécédent interventionnel (Tours, mars 2012)
- d'un cas d'infection de prothèse mammaire à *M. fortuitum* (Pitié-Salpêtrière, Paris, juillet 2012)
- d'un cas d'endocardite sur bioprothèse à *M. chelonae* chez un patient de l'hôpital départemental Stell de Rueil Malmaison), cas qui s'est finalement révélé d'origine inconnue (juillet 2012)



## 5. Activités d'information, de formation et de conseil

### 5.1. Information

De 2006 à 2012, le site internet <http://cnrmyctb.free.fr> a été régulièrement mis à jour pour :

- la fiche d'information à fournir au CNR-MyRMA en cas de demande d'expertise bactériologique (identification, tests de sensibilité aux antibiotiques, génotypage...),
- les fiches des enquêtes annuelles sur la tuberculose multirésistante et la méningite tuberculeuse qui peuvent être, soit remplies directement en ligne sur le site, soit imprimées puis remplies manuellement et envoyées,
- les résultats annuels de la surveillance de la tuberculose multirésistante et de la résistance primaire et secondaire,
- les nouvelles publications du CNR-MyRMA,
- la mise en ligne des rapports d'activité du CNR-MyRMA,
- la mise en ligne des diapositives des formations organisées ou co-organisées par le CNR-MyRMA.

### 5.2. Formation

#### Accueil de stagiaires et missions de formation en 2012

- Mme Sokleaph Cheng, Biologiste responsable du laboratoire des mycobactéries de l'Institut Pasteur du Cambodge : arrivée le 1<sup>er</sup> décembre 2012 pour 1 an (cf projet)
- Mélanie Le Goff : stage de 8 semaines de M1 de l'Université Paris 6 : « Etude de l'implication dans la résistance aux quinolones de différentes substitutions en position 543 de la sous unité GyrB de l'ADN gyrase de *Mycobacterium tuberculosis* »
- Karine Adeyema : stage de 8 semaines de Licence Science et Technologie (mention Biologie moléculaire, cellulaire et physiologie) - Université Paris-Est Créteil Val de Marne) : « Etude moléculaire de la résistance des isolats cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* à l'éthambutol »
- Andra Bostanaru, stagiaire vétérinaire roumaine 6 mois « Etude dans un modèle murin de la sélection de mutants résistants à l'isoniazide »
- Meriem Djouahra, maître assistante dans le service de la tuberculose et des mycobactéries à l'Institut Pasteur d'Algérie, stage du 10 au 24 novembre 2012 : mise en oeuvre de culture en milieu liquide en automate MGIT.
- Mission de Laurent Raskine à Port au Prince (Haïti) pour l'American Society for Microbiology : évaluation des compétences de l'équipe du service des mycobactéries du Laboratoire National de la Santé Publique, pour la mise en place de la culture des prélèvements en milieu liquide, l'identification des cultures positives et la réalisation des antibiogrammes.

#### Enseignement sur les mycobactéries et la tuberculose

Master M1 Santé « Microbiologie Médicale et Moléculaire », Universités Paris 6 et Paris 7

Master M1 « Santé Internationale et Pathologie Tropicale », Paris 6

Master M1 mention « Sciences technologie santé », UE Immunologie, Paris 12

Master M2 « Médicaments et autres produits de santé, écologie microbienne pathogénie des microorganismes et anti-infectieux », Paris 11



Master M2 « Microbiologie », Paris 6  
DU Antibiotiques et Antibiothérapie, Université Paris 7  
DIU Dermatologie infectieuse et tropicale, Université Paris 6,  
DIU Antibiologie, Université Tours-Poitiers  
DIU Antibiologie, Université Nice Sophia-Antipolis  
DIU Stratégie thérapeutique en Pathologie Infectieuse, Université Paris 5 et 7  
DIU Chimiothérapie des infections nosocomiales, Université Paris 11 et 12  
DIU médecine tropicale – santé internationale  
DIU Pathologies Infectieuses de la femme enceinte, du fœtus et du nouveau né, Université Paris 11  
DIU « tuberculose », Université Pierre et Marie Curie, Université Libre de Strasbourg  
DES Biologie Médicale, Université de Paris  
DESC Maladies Infectieuses et Tropicales

### 5.3. Activités de conseil

#### Conseils thérapeutiques pour la prise en charge des infections à mycobactéries résistantes

Sur les 92 patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants identifiés en 2012, 48 ont fait l'objet de conseils thérapeutiques et de prise en charge des malades lors de 11 réunions du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile »

Au total 148 dossiers ont été discutés durant les 11 réunions de 2012 (**Tableau 33**) :

- 48 cas de tuberculose MDR de 2012. Selon leur complexité, les dossiers de ces cas ont été examinés lors de 1 à 5 réunions. Les dossiers de 9 autres cas de tuberculose MDR (de fin d'année) ont été discutés début 2013.
- 7 dossiers de sujet contact de cas MDR pour discussion de prophylaxie
- 25 dossiers de tuberculose MDR des années précédentes (analyse de l'évolution sous traitement)
- 3 cas de tuberculose compliquée non MDR

En 2012, les participants réguliers aux réunions du « Groupe Thérapeutique » étaient :

- l'équipe du CNR-MyRMA,
- 2 praticiens du Centre Médical de Bligny (Mathilde Jachym, Nathalie Methivier),
- 1 pédiatre de l'hôpital trousseau (Katarina Chadelat),
- 2 pneumologues (Bertrand Dautzenberg Pitié-Salpêtrière, Claire Andrejak Amiens),
- 1 membre du SAMU social de Paris (Benedicte Rivoire)

**L'activité du « Groupe thérapeutique », qui avait déjà augmenté de 50% de 2009 à 2011, a doublé entre 2011 et 2012 comme le montre le Tableau 33.**



**Tableau 33 : Activités de conseil assurées par le « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries difficiles à traiter » du CNR-MyRMA de 2004 à 2012**

	N réunions de travail	N dossiers examinés	Types de dossiers
<b>2006</b>	5	11	- 2 cas XDR 2006 - 9 cas MDR 2006 (1 grossesse)
<b>2007</b>	5	13	- 2 cas XDR 2007 - 8 cas MDR 2007 (1 enfant 18 mois) - 3 prophylaxies contacts MDR
<b>2008</b>	6	44	- 22 cas MDR 2008 - 19 cas MDR 2007 (suivi) - 3 prophylaxies contacts MDR
<b>2009</b>	8	46	- 20 cas MDR 2009 - 18 cas MDR 2008 (suivi) - 8 prophylaxies contacts MDR
<b>2010</b>	9	64	- 22 cas MDR 2010 - 33 cas MDR 2008-09 (suivi) - 7 cas tuberculose compliquées non MDR - 1 prophylaxie contacts MDR - 1 mycobactériose
<b>2011</b>	11	70	- 27 cas MDR 2011 - 40 cas MDR 2009-10 (suivi) - 3 cas tuberculose compliquées non MDR
<b>2012</b>	11	148	<b>Les 148 dossiers examinés correspondent à 83 patients :</b> - 48 cas MDR-XDR 2012 (dossiers examinés 1 à 5 fois chacun) - 21 cas MDR 2011 (suivi) - 4 cas MDR 2010 (suivi) - 7 prophylaxies contacts MDR - 3 cas tuberculose compliquées non MDR

## Conseil et expertises auprès des autorités sanitaires nationales et européennes

### Autorités sanitaires nationales

- Vincent Jarlier et Emmanuelle Cambau ont participé en 2012 aux travaux du Haut conseil de la santé publique pour l'actualisation des recommandations de mise en œuvre des enquêtes autour d'un cas (plusieurs réunions).
- Vincent Jarlier et Emmanuelle Cambau ont participé en 2012 aux travaux menés à la Mutuelle de Santé Agricole (MSA) sur la tuberculose bovine et le risque de tuberculose chez les personnes en contact avec les bovins (plusieurs réunions).
- Emmanuelle Cambau a participé en décembre 2012 aux expertises pour préparer les avis de l'Agence nationale de santé en médecine (ANSM, ex AFSSAPS) transmis à l'agence médicale européenne (EMA) concernant 2 nouveaux antituberculeux, la bedaquiline (TMC 207, diarylquinoline) et le delamanid (OPC)



### **Autorités sanitaires internationales**

- Vincent Jarlier et Emmanuelle Cambau ont participé au travail du réseau de laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) créé sous l'égide de l'ECDC : 3ème workshop en avril 2012 à Londres.
- Emmanuelle Cambau a remplacé Delphine Antoine (InVS) à l' « annual meeting of joint ECDC/WHO tuberculosis surveillance network » (juin 2012).
- Emmanuelle Cambau a participé en avril 2012 (Londres) à la réunion de l'European Union Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) statuant sur la demande de mise du nouvel antituberculeux delamanid (OPC) sur le marché européen.



## 6. Travaux de recherche en lien avec l'activité du CNR-MyRMA

### 6.1. Chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries

#### Tuberculose

La résistance aux fluoroquinolones (FQ) chez *Mycobacterium tuberculosis* est principalement due à des mutations dans la seule cible des FQ chez cette espèce : l'ADN gyrase ( $GyrA_2GyrB_2$ ). La mesure de la sensibilité aux FQ (MSF) est effectuée par des méthodes phénotypiques, mais les tests génotypiques sont de plus en plus utilisés.

Nous avons comparé les performances diagnostiques de la mesure de la sensibilité aux fluoroquinolones par méthodes génotypiques et phénotypiques dans un modèle murin de la tuberculose. Pour ce faire, 60 souris Swiss ont été inoculées avec *M. tuberculosis* H37Rv et traitées par lévofloxacine 200 mg/kg pendant 6 mois. Dix souris ont été sacrifiées chaque mois. Les broyats des poumons ont été mis en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen (LJ) avec et sans ofloxacine 2 mg / L ( $OFX_2$ ) (MSF « directe »).

La MSF a également été effectuée après repiquage en utilisant la méthode des proportions sur LJ (MSF « indirecte ») en testant  $OFX_2$  et moxifloxacine 0,5, 1 et 2 mg / L ( $MXF_{0,5}$ ,  $MXF_1$  et  $MXF_2$ ). Enfin, le séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB* a été réalisé sur culture primaire et sur au plus 5 colonies de chaque milieu contenant une FQ.

La proportion d'animaux hébergeant des mutants résistants aux FQ est passée de 3/10 à 1 mois à 9/10 à 6 mois. 50% des souris hébergeaient une population homogène, la même mutation étant retrouvée sur les différents milieux contenant des FQ ; 15% des souris hébergeaient une population hétérogène avec un mélange de différentes mutations et 35% des souris hébergeaient des mutations qui ont été trouvées sur une partie seulement des différents milieux contenant des FQ ( $OFX_2$ ,  $MOX_{0,5}$ , 1 et 2 mg / L). Ainsi pour 50% des souris, utiliser seulement un des 4 milieux aurait conduit à un diagnostic de la résistance aux FQ faux ou incomplet. Par ailleurs, la catégorisation des souches comme résistante (> 1% mutants) était différente pour 7% des souris selon que le test phénotypique utilisé était le MSF « directe » ou « indirecte ».

Parmi les 51 souris avec culture positive sur un des milieux contenant des FQ, 35 avaient des mutations (20 dans *gyrA*, 12 dans *gyrB* et 3 dans les deux gènes), alors qu'aucune mutation n'a été trouvée chez 16 souris (31%). Certaines mutations, le plus souvent impliquées dans une résistance de bas niveau, ont été trouvées exclusivement sur  $MXF_{0,5}$  ou  $OFX_2$  (D89G, D94A dans *GyrA* et R485C, S486F et E540A dans *GyrB*).

Le séquençage effectué directement sur le tube de culture primaire sans FQ n'a détecté une mutation que lorsque sa proportion par rapport à la population bacillaire totale était de 100% (soit seulement 3/35 souris). Ainsi, il apparaît que le diagnostic moléculaire manque fortement de sensibilité en cas de population hétérogène.

En conclusion, les méthodes génotypiques et phénotypiques effectuées à partir des poumons des souris infectées et traitées par fluoroquinolones donnent des résultats divergents, aucune n'étant en mesure de détecter tous les mutants résistants, notamment en cas de faible niveau de résistance ou de population hétérogène. L'émergence de la résistance aux FQ in vivo est un phénomène complexe qui implique des mécanismes de résistance non liés à des mutations de l'ADN gyrase dans 1/3 des cas.



## Ulcère de Buruli

Nous avons évalué l'activité stérilisante dans l'infection à *M. ulcerans* chez la souris d'un régime intermittent (2 fois/semaine) par voie orale (Rifapentine-Moxifloxacine) ou injectable (Rifapentine-Streptomycine)

L'objectif de cette nouvelle expérience était d'évaluer la possibilité de mettre au point un traitement intermittent entièrement supervisable permettant d'être synchrone des visites pour les soins des lésions. Les bases rationnelles étaient les résultats antérieurs (Ji AAC 2008) qui avaient montré :

- une bonne activité bactéricide et stérilisante de l'association rifampicine - moxifloxacine administrées tous les jours,
- une bonne activité bactéricide des associations rifapentine - moxifloxacine et rifapentine - streptomycine administrées 2 fois par semaine, ce qui ouvre la possibilité de traitements intermittents par rifapentine (rifampicine à ½ vie longue) associée à de la moxifloxacine (traitement oral) ou de la streptomycine (traitement injectable).

Nous avons choisi la moxifloxacine et non pas la clarithromycine pour le traitement oral intermittent 2 fois par semaine car la ½ vie de la clarithromycine est trop courte et exposerait à de longues périodes de monothérapie par rifapentine et donc à la sélection de mutants résistants.

Méthode : 280 souris BALB/c femelles âgées de 4 semaines ont été inoculées fin septembre 2011 avec la souche CU01 (4,36 log/patte), début des traitements en novembre 2011 après l'incubation de 5 semaines nécessaire pour atteindre un index lésionnel de grade 2-3, mesure de l'activité bactéricide par l'évolution de l'index lésionnel et des cultures à 1, 2, 4 et 8 mois de traitement, fin des traitements en janvier 2012, mesure de l'activité stérilisante par le taux de rechute clinique et bactériologiques au décours d'une période de 28 semaines après la fin des traitements, soit à la fin de juillet 2012.

Les index lésionnels, de grade 2-3 en début de traitement, ont augmenté jusqu'aux grades 3-4 (lésions étendues) dans le groupe non traité mais ont diminué progressivement jusqu'au grade 1 (minime lésion locale) pour les 2 groupes traités 2 fois/semaine (et dans le groupe témoin rifampicine-clarithromycine 5/7).

Le nombre de bacilles cultivables a diminué jusqu'à négativation des cultures en fin de traitement chez tous les animaux pour les 2 groupes traités 2 fois/semaine (1 seule souris faiblement positive en fin de traitement dans le groupe témoin rifampicine-clarithromycine 5/7).

L'évolution à la fin des 28 semaines d'observation après la fin du traitement a été identique dans 2 groupes traités 2 fois/semaine : pas de rechute clinique ni bactériologique.

En conclusion, cette expérience apporte la 1<sup>ère</sup> démonstration de l'efficacité stérilisante dans l'infection à *M. ulcerans* chez la souris de régimes thérapeutiques intermittents, donc entièrement supervisables, et reposant sur un total de 16 prises seulement.

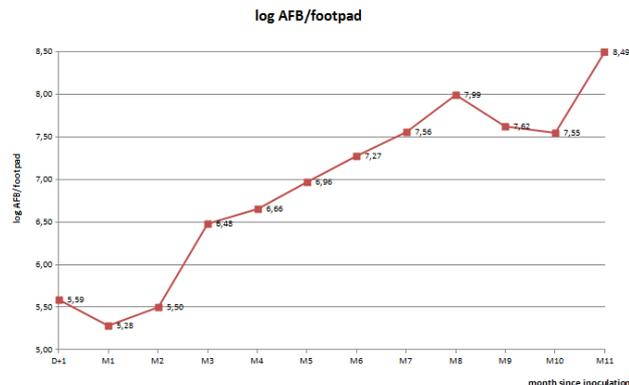
Malgré cette preuve de concept très importante, ces 2 régimes présentent des désavantages notables :

- le 1<sup>er</sup> (rifapentine – streptomycine) est injectable
- le 2<sup>ème</sup> (rifapentine – moxifloxacine) est oral mais est à base de quinolones et ne peut donc être administré chez l'enfant.

## Lèpre

Nous avons en 2011 repris le modèle de souris Nude pour la lèpre, modèle plus sensible mais plus contraignant et plus coûteux que le modèle souris Swiss, et que nous avons abandonné pour ces raisons il y a une quinzaine d'années. Désormais, tous les cas de lèpre multibacillaire pour lesquels nous recevons une biopsie datant de moins de 4 jours sont ensemencés sur souris Nude.

Parce que les données disponibles sur la multiplication *in vivo* de *M. leprae* sont très anciennes et concernent essentiellement la souris swiss, la souris thymectomisée ou irradiée (Rees, Nature, 1967 ; Shepard, J. Exp. Med, 1960), nous avons en 2012 déterminé la courbe de croissance dans notre modèle Nude (Figure 1). Le nombre de bacilles atteint  $10^{8,5}$  par coussinet plantaire après 11 mois de culture. Ces données seront très utiles pour nos futures études visant à obtenir ou comparer entre eux des mutants isogéniques résistants aux antibiotiques.



**Figure :** courbe de croissance obtenue chez la souris Nude durant une période de 11 mois après l'inoculation de  $1,6 \times 10^6$  bacilles de *M. leprae* (souche Thai-53) dans le coussinet plantaire de la patte arrière. Deux souris ont été sacrifiées chaque mois et les bacilles dénombrés au microscope. Le nombre de bacilles par patte est exprimé en log.

La reprise du modèle de souris Nude nous permet maintenant la conservation systématique in vivo, et la production pour des travaux de génétique, de souches de *M. leprae* présentant divers phénotypes de résistance aux antiléprieux. Les pattes de souris infectées sont utilisées pour les repiquages in vivo et sont congelées pour conservation.

## 6.2. Synthèse de nouvelles fluoroquinolones et évaluation de leur activité in vitro sur l'ADN gyrase de *M. leprae* et de *M. tuberculosis*

Nous avons montré dans nos précédents travaux (cf. rapports des années précédentes) que tester l'activité inhibitrice de nouvelles quinolones ou de molécules ayant la même cible (pyridones, coumarines, simocyclinone...) sur l'ADN gyrase de *M. leprae* purifiée, sauvage ou portant des mutations conférant la résistance aux fluoroquinolones « classiques » (ofloxacin), constitue une méthode fiable et très économique qui permet un screening initial et de ne poursuivre l'évaluation par de longs essais in vivo que sur les molécules pour lesquelles l'activité sur la cible est encourageante (Aubry AAC 2004, Aubry AAC 2006, Aubry Biochem Biophys Res Commun 2006, Matrat, AAC 2006, Matrat AAC 2007, Matrat AAC 2008).

En 2010, nous avons initié un projet de synthèse de nouvelles fluoroquinolones avec l'équipe de G. Anquetin (Faculté des Sciences, Université Paris 5), projet guidé par les données de relation structure-activité obtenues à travers les travaux publiés, en particulier les nôtres, sur l'ADN gyrase des mycobactéries. Un des éléments clés de l'activité des fluoroquinolones sur les ADN gyrases des mycobactéries est la nature du radical en C7 : piperazine dans la gatifloxacine et la moxifloxacine, composés les plus actifs sur *M. leprae*, et isoindolinyll dans la garénofloxacine, composé qui garde son activité sur l'ADN gyrase de *M. leprae* mutée résistante à l'ofloxacin après sélection sous traitement (Cambau 2002, Matrat AAC 2007, Matrat 2008).

La mise au point de la synthèse de la garénofloxacine étant plus complexe que celle de la moxifloxacine, les premiers dérivés synthétisés sont des dérivés de la moxifloxacine. Les synthèses ont été centrées sur l'hétérocycle en C-7 en diversifiant sa taille et sa nature dans l'objectif de : (1) contrôler la lipophilie de la molécule, (2) augmenter le nombre de ponts hydrogènes donateurs/accepteurs avec différentes fonctions (ester, carbamate, et amide), (3) laisser la seconde amine de la piperazine libre.

Si deux des 10 molécules synthétisées, ont une activité équivalente à l'ofloxacin, toutes ont une activité inférieure à la gatifloxacine et à la moxifloxacine sur *M. tuberculosis* et *M. leprae*. Cependant nos résultats, qui sont parmi les rares à avoir étudié l'impact de substitutions du radical R(3)', pourront aider à concevoir de nouveaux dérivés de la famille des quinolones dans le futur. Ces résultats viennent d'être publiés dans



Bioorganic & Medicinal Chemistry.

## 6.3. Mécanismes de résistance chez les mycobactéries

### Mécanisme de résistance acquise aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*

L'objectif était d'explorer par des outils moléculaires les souches de *M. tuberculosis* MDR pour savoir rapidement si elles sont ou non sensibles aux quinolones. Pour cela nous disposons depuis 2004 d'un outil fiable (ADN gyrase produite par génie génétique) permettant de tester l'implication de nouvelles mutations de l'ADN gyrase dans la résistance aux quinolones. Ainsi, en 2012, nous avons montré que 4 mutations de la sous unité GyrB de souches cliniques de *M. tuberculosis* étaient impliquées dans la résistance aux quinolones. Deux de ces mutations sont situées dans la QRDR (D500A et N538T), tandis que deux autres sont situées en dehors de la QRDR (T539P and E540V).

Ces résultats montrent (1) la présence d'une région constituée de 3 acides aminées dans laquelle se concentrent des mutations impliquées dans la résistance aux quinolones (résidues NTE, 538 to 540) et (2) que les limites de la QRDR de GyrB doivent être modifiées pour inclure les positions 539 et 540 (Pantel, AAC, 2012).

### Mécanisme de résistance acquise à l'isoniazide et à l'éthionamide chez *M. tuberculosis*

Pour être actifs contre *Mycobacterium tuberculosis*, l'isoniazide (INH) et l'éthionamide (ETH) ont besoin d'être activés par la catalase/ peroxydase KatG (pour l'INH) et la mono-oxygénase EthA (pour l'ETH, régulée par EthR) (Baulard, J Biol Chem, 2000). L'ETH et INH ciblent l'enzyme InhA impliquée dans la synthèse de la paroi cellulaire (Banerjee, Science, 1994). Les isolats cliniques résistants (R) à l'INH et à l'ETH ont un large éventail de mutations altérant (1) *katG* (mutation S315T trouvée dans 70% des isolats INH-R), (2) *ethA* (différentes mutations trouvées dans 50% des isolats ETH-R) et, (3) *inhA* et le promoteur de *inhA* (25% des isolats INH-R et 65% des isolats ETH-R, et conférant une co-résistance à l'INH et l'ETH).

Nous avons sélectionné des mutants INH-R et ETH-R *in vitro* dans le but d'étudier, dans un contexte isogénique, l'effet des mutations trouvées dans les isolats cliniques. Des mutants de *M. tuberculosis* H37Rv et H37Ra ont été sélectionnés *in vitro* dans des milieux de Middlebrook 7H11 contenant de l'INH (concentrations de 0,012 à 12,8 mg/l) et de l'ETH (concentrations de 0,12 à 128 mg/l) ensemencés avec  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  bactéries par boîte. La proportion de mutants obtenus *in vitro* était de  $10^{-5}$  pour INH à 0,2 mg/l et ETH à 0,2 mg/l.

Les mutants sélectionnés sur INH (n=68) avaient soit un gène *katG* sauvage (21), soit des mutations dans *katG* (47/68, dont mutation non-synonyme (12/68), codon STOP (14/68), insertion (2/68), délétion partielle (13/68) et complète (6/68) de *katG*). Pour aucun des mutants INH-R, nous n'avons détecté de mutation dans *inhA* et/ou son promoteur.

Seuls 12 des 46 mutants sélectionnés sur ETH avaient des altérations dans *ethA* (11/46) ou dans la région intergénique *ethA-ethR* (1/46), avec les mutations suivantes dans *ethA*: non-synonyme (5/46), codon STOP (4/46) et délétion (2/46). Pour aucun des mutants ETH-R nous n'avons détecté de mutation dans *ethR*, *inhA* et/ou son promoteur.

Etonnamment, la mutation la plus fréquente (KatG S315T) dans les isolats cliniques INH-R, n'a pas été trouvée chez les mutants INH-R sélectionnés *in vitro* qui avaient préférentiellement des délétions dans *katG* (48%). De même, la mutation -15ct dans le promoteur de *inhA*, qui est habituellement présente dans les isolats cliniques montrant une co-résistance à l'INH et à l'ETH (trouvée dans 20 % des souches cliniques INH-R (Brossier, JCM, 2006), et dans 60% des souches cliniques ETH-R (Brossier, AAC, 2011 – Morlock, AAC, 2003)), n'a pas été trouvée dans les mutants ETH-R sélectionnés *in vitro* qui avaient seulement des mutations dans *ethA*. Les mutations dans *ethA* sont trouvées dans 50% des souches cliniques ETH-R (Brossier, AAC, 2011 – Morlock, AAC, 2003) et dans 24% des mutants ETH-R sélectionnés *in vitro*. Finalement, pour respectivement 31% et 74% des mutants INH-R et ETH-R obtenus *in vitro*, aucune mutation n'a été trouvée dans *ethA*, *ethR*, *katG*, *inhA* et son promoteur (contre <10% et <20% des souches cliniques INH-R et ETH-R).

En conclusion, la distribution des mutations obtenues *in vitro* ne reflète pas celle habituellement observés dans



les isolats cliniques de *M. tuberculosis* INH- et ETH-R. Il est possible que cela soit due à une sélection, chez l'homme, des mutants ayant une activité catalase/peroxydase conservée.

### **Mécanismes de résistance acquise à la clarithromycine chez *M. abscessus***

*M. abscessus* est responsable d'infections respiratoires sévères et d'infections cutanéomuqueuses iatrogènes. Malgré un traitement bien mené reposant sur une combinaison d'antibiotiques dont la clarithromycine est la molécule clé, des échecs cliniques sont souvent observés. La découverte du gène *erm41*, codant une ARN méthylase responsable d'une résistance inductible à la clarithromycine, a émis l'hypothèse que cette résistance naturelle était responsable des échecs. Or des cas de résistance acquise par sélection de mutants résistants (mutation du gène *rrl* codant l'ARNr23S en positions 2058 ou 2059) ont aussi été rapportés comme cause d'échec. Nous avons déjà montré que les 3 sous espèces de *M. abscessus* (*M. abscessus* sensu stricto, *M. bolletii* et *M. massiliense*) n'avaient pas le même phénotype et génotype de résistance naturelle à la clarithromycine avec 4 groupes: *M. abscessus* sequevar *erm41T28-ClaR*, *M. abscessus* sequevar *erm41C28-ClaS*, *M. bolletii* *erm41complet-ClaR*, et *M. massiliense* *erm41del278-ClaS* (Bastian AAC 2011).

Notre objectif était de caractériser les mécanismes de résistance acquise *in vitro* chez ces 4 groupes de *M. abscessus*. Nous avons sélectionné des mutants résistants à la clarithromycine à partir d'une souche représentative de chacun des 4 groupes, étudié leur phénotype de résistance à la clarithromycine par mesure des CMI et caractérisé leur génotype par séquençage des gènes *rrl*, *erm41*, *rplV* et *rplD* (codant les protéines L22 et L4).

Pour *M. abscessus* sequevar *erm41C28* et chez *M. massiliense*, 100% et 97%, des mutants sélectionnés avaient une mutation du gène *rrl* en position 2058 ou 2059. Pour *M. abscessus* sequevar *erm41 T28* et *M. bolletii*, l'une de ces 2 positions du gène *rrl* n'était mutée que chez 30% et 52% des mutants. En étudiant les mutants non mutés en 2058 ou 2059 du gène *rrl*, nous avons découvert une insertion répétée de 18 paires de bases dans le gène *rplV* chez un mutant de *M. massiliense*.

Ces résultats montrent que le principal mécanisme de résistance acquise à la clarithromycine chez *M. abscessus* sequevar *erm41 C28* et *M. massiliense* est une mutation du gène *rrl* en position 2058 ou 2059. Chez *M. abscessus* sequevar *erm41 T28* et *M. bolletii* moins de 50% de cette résistance est liée à une mutation du gène *rrl* en position 2058 ou 2059, l'autre moitié étant probablement liée à la résistance induite par l'ARN méthylase.

## **6.4. Etude génotypique des mycobactéries**

### **Epidémiologie moléculaire des souche de *M.tuberculosis* circulant en France**

En combinant les techniques de spoligotyping (43 spacers) et de MIRU-VNTR (24 loci) nous avons analysé la structure populationnelle des souches de *M. tuberculosis* en circulation en France durant la période 2006-2011.

L'étude a porté sur un total de 401 souches reçues au CNR-MyRMA : 211 souches MDR dont 11 XDR, 82 souches résistant mais non MDR (24 résistantes à l'INH, 7 à la rifampicine, 6 à la streptomycine (Str), 40 à INH-Str-R, 4 à INH-Str-éthambutol (Emb), 1 à INH--Emb) et 108 souches multisensibles.

Les relations phylogénétiques ont été interprétées aussi à la lumière des phénotypes de résistance des souches. Des dendrogrammes ont été établis par la méthode UPGMA.

Nous avons identifié 14 lignées MIRU-VNTR et 3 nouveaux sous-groupes, comme suit :

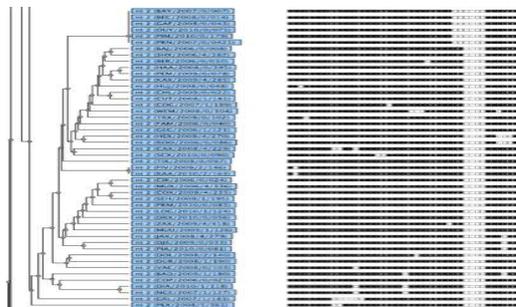
Sous-groupe 1 (8 souches, ci-dessous en parme)

- patients nés au Congo
- T2-spoligotype dit Uganda I
- 7/8 souches étaient MDR/XDR
- GyrA = T73A



Sous-groupe 2 (48 souches, ci-dessous en bleu) :

- même T-spoligotype
- profils de résistance
- pays de naissance variés (Europe, Afrique)



Sous-groupe 3 (15 souches, ci-dessous en vert) :

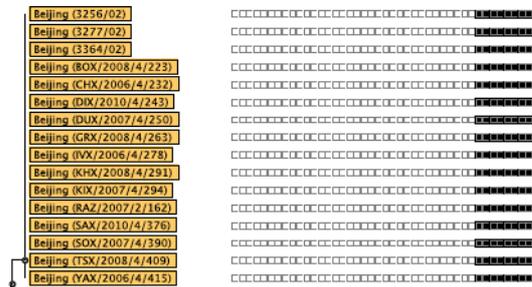
- même T-spoligotype
- 15/15 MDR
- 10 souches de même cluster, partageant la mutation KatG A110V
- pays de naissance : Afrique centrale (Angola, Congo)



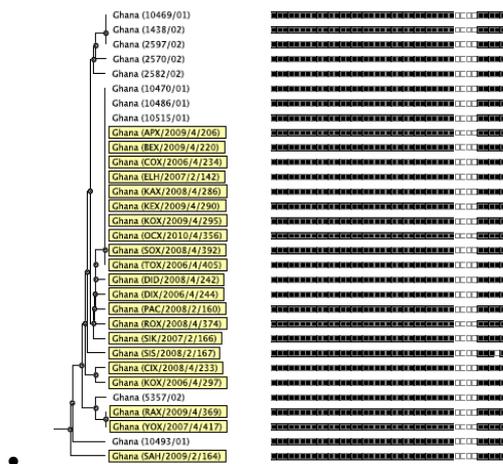
Au delà de ces 3 sous-groupes, de large grappes de souches de même spoligotype et profil MIRU-VNTR 24 loci ont été identifiés, mais ne correspondent pas à des cas épidémiologiquement liés sur la base des données disponibles, incluant pays de naissance, ville, mutations de résistance.

Les 2 grappes les plus importantes, en grande partie constitués de souches MDR, ont été identifiées au sein :

- de la famille Beijing : grappe de 13 souches :



- la lignée Ghana : grappe de 10 souches :



En analysant les relations entre lignées phylogéniques et profils de résistance aux antituberculeux, nous n'avons pas trouvé d'association exclusive.

Cependant, comme le montre le tableau ci-dessous :

- la lignée Beijing représente 1/3 des souches MDR, 1/4 des souches résistantes à INH-Str mais seulement 8% des souches monorésistantes et 5% des souches sensibles
- la lignée Ghana n'est représentée que parmi les souches MDR et résistantes à INH-Str
- la lignée T-nt2 représente 1/4 des souches sensibles ou monorésistantes mais seulement 3% des souches MDR
- la lignée T-nt3 n'est représentée que parmi les souches MDR.

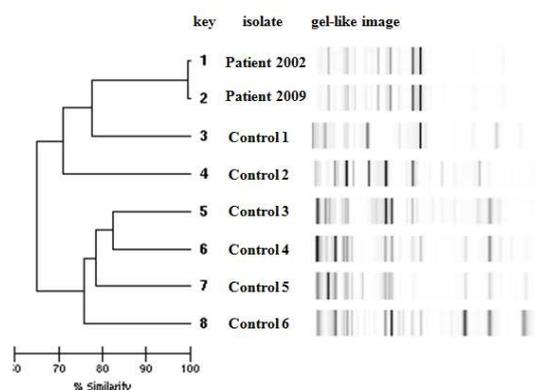


Lignées MIRU-VNTRplus																		
	Beij.	X	Bov.	C	D/C	EAI	G	H	LAM	S	U	T	Waf1	Waf2	nt 1	nt 2	nt 3	
S (n=108)	5%	2%	3%	3%	3%	6%		15%	14%		1%	2%	2%	10%	11%	1%	23%	
	n=5	n=2	n=3	n=3	n=3	n=7		n=16	n=15		n=1	n=2	n=2	n=11	n=12	n=1	n=25	
MDR/XDR (n=211)	31%	2%		3%	1%	1%	8%	7%	13%	4%	3%			0%	11%	3%	4%	7%
	n=66	n=4		n=6	n=3	n=3	n=16	n=15	n=28	n=8	n=7			n=1	n=23	n=7	n=9	n=15
(STR-R)	(n=64)	(n=3)		(n=5)	(n=2)	(n=1)	(n=10)	(n=9)	(n=16)	(n=7)	(n=7)			(n=1)	(n=14)	(n=6)	(n=6)	(n=4)
INH-STR-R (n=44)	23%			5%	2%	2%	11%	14%	27%				2%		7%		7%	
	n=10 <sup>(a)</sup>			n=2	n=1	n=1	n=5	n=6	n=12				n=1		n=3		n=3	
INH-R (n=25)	4%		4%		8%	28%		4%	20%						12%		20%	
	n=1		n=1		n=2	n=7 <sup>(b)</sup>		n=1	n=5						n=3		n=5	
RMP-R (n=7)	14%							14%	14%			14%					43%	
	n=1							n=1	n=1			n=1					n=3	
STR-R (n=6)	17%					17%		17%									50%	
	n=1					n=1		n=1									n=3	

Beij. : Beijing, Bov. : Bovis, C : Cameroon, D/C : Delhi/CAS, G : Ghana, H : Haarlem, T: TUR, U : URAL, Waf : West African. (a) 4 INH-STR-Emb-R (b) 1 INH-Emb-R

### **Infection récurrente à *Mycobacterium avium* après sept ans de latence chez un patient séropositif pour le VIH recevant une trithérapie antirétrovirale efficace**

Nous avons rapporté le premier cas de réactivation d'infection à *Mycobacterium avium*, après une latence prolongée, chez un patient séropositif pour le VIH recevant une thérapie antirétrovirale efficace (réplication virale indétectable et taux de CD4 normal) (Bussone, J Infect, 2012). Ce patient a présenté une inflammation douloureuse à l'épaule sept ans après une bactériémie à *M. avium*. Une ponction articulaire a permis d'isoler une souche de *M. avium*, dont la rep-PCR Diversilab a permis de montrer qu'elle était identique à celle isolée lors de la bactériémie (et différentes de 6 souches témoins), démontrant ainsi la réactivation de l'infection à *M. avium* chez ce patient.



**Figure.** Dendrogramme de la rep-PCR Diversilab de 8 souches de *Mycobacterium avium* : 2 souches du patients (isolée en 2002 des hémocultures et isolée en 2009 du liquide articulaire) et 6 souches témoins



## 7. Publications et communications 2012

### 7.1. Publications nationales

- Veziris N., Jarlier V. and Robert J. La résistance aux antituberculeux en France en 2009-2010. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire. 2012. BEH. 24-25:291-3.
- Veziris N. Bacteriological diagnosis of tuberculosis. Rev. Prat. 2012;62:490-2.
- Sougakoff W. Nouvelles cibles bactériennes pour les mycobactéries. Antibiotiques. 2009. Sept;11(3) :164-170.
- Brossier F. [Mécanismes d'action et de résistance de l'isoniazide, un antituberculeux de première ligne.](#) Journal des Anti-infectieux.2011;13:217-27.
- Fillion A., Pantel A., Veziris N. and Aubry A. Place des fluoroquinolones dans le traitement des tuberculoses à bacilles résistants. La lettre de l'infectiologue. 2012;27(1):20-24.
- V Meyssonier, A Guihot, K Chevet, N Veziris, L Assoumou, A Bourgarit, D Costagliola, E Caumes, G Carcelin. [Performance of Quantiferon\(®\) for the diagnosis TB.](#) Médecine et maladies infectieuses. 2012. 42 (12) p. 579-84

### 7.2. Publications internationales

- Bernard C., Sougakoff W., Fournier A., Larnaudie S., Antoun F., Robert J., Brossier F., Truffot-Pernot C., Jarlier V. and Veziris N. Impact of a 14-year screening programme on tuberculosis transmission among the homeless in Paris. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2012;16:649-655.
- Meyssonier V., Veziris N., Bastian S., Texier-Maugein J., Jarlier V. and Robert J. Increased primary drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in younger birth cohorts in France. J. Infect. 2012;64:589-595.
- Darmon A., Piton J., Roué M., Petrella S., Aubry A. and Mayer C. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase CTD. Acta Crystallographica Section F crystallization communications. 2012;68(Pt 2):178-80.
- Maruri F., Sterling T., Kaiga A., Blackman A., Van der Heijden Y., Mayer C., Cambau E. and Aubry A. A Systematic Review of Gyrase Mutations Associated with Fluoroquinolone-Resistant Mycobacterium tuberculosis and a Proposed Gyrase Numbering System. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2012; 67(4):819-31.
- Pantel A., Petrella S., Veziris N., Brossier F., Bastian S., Jarlier V., Mayer C. and Aubry A. Extending GyrB QRDR definition in Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase for assessing FQ resistance in M. tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 2012;56(4):1990-6.
- Vincent Broutin, Anne-Laure Bañuls, Alexandra Aubry, Nicolas Keck, Marc Choisy, Jean-François Bernadet, Christian Michel, Jean-Christophe Raymond, Cédric Libert, Antoine Barnaud, Pieter Stragier, Françoise Portaels, Dominique Terru, Claudine Belon, Olivier Dereure, Cristina Gutierrez, Maria-Laura Boschioli, Philippe Van De Perre, Emmanuelle Cambau, and Sylvain Godreuil. Genetic diversity and population structure of Mycobacterium marinum: New insights into host and environmental specificities. J Clin Microbiol. 2012 ; 50(11):3627-34
- Segala E., Sougakoff W., Nevejans-Chauffour A., Jarlier V. and Petrella S. Characterization of new mutations in the mycobacterial ATP synthase: New insights in the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase c-ring structure. Antimicrob. Agents Chemother. 2012;56(5):2326-34.
- de Beer J.L., Kremer K., Ködmön C., Supply P. and van Soolingen D. Global Network for the Molecular



- Surveillance of Tuberculosis 2009. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J. Clin. Microbiol.* 2012 Mar;50(3):662-9.
- Bussone G., Brossier F., Roudiere L., Bille E., Sekkal N., Charlier C., Gilquin J., Lanternier F., Lecuit M., Lortholary O. and Catherinot E. [Recurrent \*Mycobacterium avium\* infection after seven years of latency in a HIV-infected patient receiving efficient antiretroviral therapy.](#) *J. Infect.* 2012;64:613-7.
  - Ruf M.T., Schütte D., Chauffour A., Jarlier V., Ji B. and Pluschke G. [Chemotherapy-associated changes of histopathological features of \*Mycobacterium ulcerans\* lesions in a Buruli ulcer mouse model.](#) *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 Feb;56(2):687-96.
  - Cambau E., Chauffour-Nevejans A., Tejmar-Kolar L., Matsuoka M. and Jarlier V. Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType LepraDR, a novel ready-to-use molecular test. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2012 ; 6(7):e1739
  - L Legout, N Ettahar, M Massongo, N Veziris, F Ajana, E Beltrand, E Senneville. Osteomyelitis of the wrist caused by *Mycobacterium arupense* in an immunocompetent patient: a unique case. *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases.* 2012. 16 (10) p. e761-2
  - Elodie Lhuillier, Olivier Brugière, Nicolas Veziris, Claire Danel, Bruno Mourvilliers, Hervé Mal, Gaëlle Dauriat, Raymond Ruimy. Relapsing *Mycobacterium genavense* infection as a cause of late death in a lung transplant recipient: case report and review of the literature. *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation.* 2012. 10 (6) p. 618-20
  - Marie-Anne Cosson, Jean-Baptiste Bertrand, Clémence Martin, Nicolas Veziris, Capucine Picard, Claire Goulvestre, Sophie Coignard, Jean-Pierre Benoit, Stéphane Silvera, Marie-Rose Moro, Claire Poyart, Philippe C Morand. Temporal interferon-gamma release response to *Mycobacterium kansasii* infection in an anorexia nervosa patient.. *Journal of medical microbiology.* 2012. 61 (Pt 11) p. 1617-20
  - G.B. Migliori, G. Sotgiu, N. R. Gandhi, D. Falzon, K. DeRiemer, R. Centis, M.G. Hollm-Delgado, D. Palmero, C. Pérez-Guzmán, M.H. Vargas, L. D'Ambrosio, A. Spanevello, M. Bauer, E.D. Chan, H.S. Schaaf, S. Keshavjee, T.H. Holtz, Dick Menzies, and The Collaborative Group for Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB. Drug resistance beyond XDR-TB: results from a large individual patient data meta-analysis. *Eur Respir J* 2012
  - S. Ahuja, D. Ashkin, M. Avendano, R. Banerjee, M. Bauer, J.N. Bayona, M.C. Becerra, A. Benedetti, M. Burgos, R. Centis, E. D. Chan, C-Y. Chiang, H. Cox, L. D'Ambrosio, K. DeRiemer, N.H. Dung, D. Enarson, D. Falzon, K. Flanagan, J. Flood, L. Garcia-Garcia, N. Gandhi, R.M. Granich, M.G. Hollm-Delgado, T.H. Holtz, M.D. Iseman, L.G. Jarlsberg, S. Keshavjee, H.R. Kim, W. J. Koh, J. Lancaster, C. Lange, W.C.M. de Lange, V. Leimane, C.C. Leung, J. Li, D. Menzies , G.B. Migliori, S.P. Mishustin, C.D. Mitnick, M. Narita, P. O'Riordan, M. Pai, D. Palmero, S.K. Park, G. Pasvol, J. Pena, C. Pérez-Guzmán, M.I.D. Quelapio, A. Ponce-de-Leon, V. Riekstina, J. Robert, S. Royce, H.S. Schaaf, K.J. Seung, L. Shah, K. Shean, T.S. Shim, S.S. Shin, Y. Shiraishi, J. Sifuentes-Osornio, G. Sotgiu, M.J. Strand, P. Tabarsi, T.E. Tupasi, R. van Altena, M. Van der Walt, T.S. Van der Werf, M.H. Vargas, P. Viikklepp, J Westenhause, W.W. Yew, J.J. Yim on behalf of The Collaborative Group for Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB"(in alphabetic order). Multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9153 patients. *PLoS Med* 2012;9(8): e1001300.
  - Global tuberculosis report 2012. WHO ed. Geneva 2012. WHO/HTM/TB/2012.6. ISBN 978-92-4-156450-2 (participation à la rédaction du rapport annuel de l'OMS).
  - Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Apr;67(4):810-8.

### 7.3. Chapitres d'ouvrages

N. Veziris, A. Aubry, J. Robert, E. Cambau, V. Jarlier, C. Truffot-Pernot. Mycobactéries. In *Antibiogramme*, - 3<sup>ème</sup> Edition, Courvalin, Leclercq eds. Ed ESKA, Paris 2012, pp. 663-687.



## 7.4. Communications nationales

- Anquetin G., Gomez C., Chauffour A., Jarlier V. and Aubry A. Synthesis and biological activity of new quinolones against *M. leprae*. XIX<sup>ème</sup> Journées des Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique. 2012.
- Fillion A. and Veziris N. Évaluation de l'efficacité de la moxifloxacine dans le traitement des tuberculoses à bacilles résistants à l'ofloxacine. 17<sup>e</sup> Congrès de Pneumologie de Langue Française. Lyon. 2012.
- Aurélie Fillion, Alexandra Aubry, Florence Brossier, Aurélie Chauffour, Vincent Jarlier and Nicolas Veziris. Faut-il ajouter la moxifloxacine au traitement des tuberculoses ultra-résistantes? Evaluation dans un modèle murin. Communication orale. 32<sup>èmes</sup> Réunions Interdisciplinaires de Chimiothérapie Anti-Infectieuses (RICAI). 2012
- Christine Bernard, Nicolas Veziris, Florence Brossier, Wladimir Sougakoff, Vincent Jarlier, Jérôme Robert, Alexandra Aubry. L'analyse systématique des mutations de l'ADN gyrase est indispensable à l'élaboration d'une stratégie fiable pour le diagnostic de la résistance aux fluoroquinolones chez *Mycobacterium tuberculosis*. Poster. 32<sup>èmes</sup> Réunions Interdisciplinaires de Chimiothérapie Anti-Infectieuses (RICAI) 2012
- Brossier F, Sougakoff W, Bernard C, Jarlier V, Veziris N. Difficulté d'identification des mycobactéries du groupe *M. abscessus*. Poster. 32<sup>èmes</sup> Réunions Interdisciplinaires de Chimiothérapie Anti-Infectieuses (RICAI) 2012.
- Kramkimel N, Franck N, Brossier F, Coignard S, Heym B, Carlotti A, Schmitt A, Gaillard JL, Dousset B, Dupin N, Poyart C, Morand P. Haematogenous disseminated cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection following catheter-borne bacteraemia. Poster. 32<sup>èmes</sup> Réunions Interdisciplinaires de Chimiothérapie Anti-Infectieuses (RICAI) 2012.
- F. Mechaï, B. Wyplosz, E. Krastinova, O. Bouchaud, J. Robert. Evaluation des pratiques françaises concernant la tuberculose bacillifère. 13<sup>ème</sup> Journées Nationales d'Infectiologie. Tours, 13-15 juin 2012.
- T.V. Bui, V. Meyssonier, D. Che, D. Antoine, V. Jarlier, J. Robert. La méningite tuberculeuse à culture positive en France chez les enfants de moins de 5 ans entre 2000 et 2010. 32<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 22-23 novembre 2012.
- T.V. Bui, V. Meyssonier, D. Che, D. Antoine, V. Jarlier, J. Robert. Décroissance de la méningite tuberculeuse à culture positive en France de 1990 à 2007. 32<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 22-23 novembre 2012.
- V. Meyssonier, T.V. Bui, N. Veziris, C. Bernard, V. Jarlier, J. Robert. Tuberculose monorésistante à la rifampicine : incidence et évaluation de la prise en charge en France. 32<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 22-23 novembre 2012
- Mougari F., Raskine L, Ferroni A., Marcon E., Sermet-Gaudelus I., Cambau E Place de la rep-PCR semi-automatisée pour l'analyse du complexe *Mycobacterium abscessus*, Vaincre la mucoviscidose : 13<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs, avril 2012, Institut Pasteur, Paris
- Mougari F., Crockett F., Chau F., Raskine L., Bouziane F., Veziris N., Cambau, Etude de la résistance acquise à la clarithromycine chez des mutants de *Mycobacterium abscessus* Poster n°374, 32<sup>e</sup> Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Nov 2012, CNIT - Paris La Défense, France

## 7.5. Communications internationales

- Bernard C., Veziris N., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V., Robert J. and Aubry A.. Correlation between fluoroquinolone resistance and mutations in the *gyrA/gyrB* genes observed in *M. tuberculosis* clinical isolates collected in France from 2004 to 2010. 22<sup>nd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious



- Diseases. London, Great-Britain. 2012.
- Brossier F., Cambau E., Tessier E., Jarlier V., Sougakoff W. Resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* selected in vitro do not reflect the in vivo mechanisms of ethionamide and isoniazid resistance. 22<sup>nd</sup> ECCMID meeting. London, Great-Britain. 2012.
  - Bernard C., Willand N., Déprez B., Jarlier V., Baulard A. and Veziris N. EthR inhibitor BDM41906 boosts the in vivo antituberculous activity of ethionamide in a murine model. 22th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, Great-Britain. 2012.
  - Anquetin G., Gomez C., Capton E., Pantel A., Jarlier V. and Aubry A. Quinolones synthesis and biological activities against *M. leprae* and *M. tuberculosis*. 13th Tetrahedron Symposium (Challenges in Bioorganic and organic Medicinal Chemistry). 2012, Amsterdam
  - C. Bernard, N. Veziris, F. Brossier, W. Sougakoff, V. Jarlier, J. Robert, A. Aubry Correlation between fluoroquinolone resistance and mutations in the *gyrA/gyrB* genes observed in *M. tuberculosis* clinical isolates collected in France from 2004 to 2010. 22<sup>nd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, poster. 2012
  - Amelie Darmon, Aurelie Bouige, Jeremie Piton, Stephanie Petrella, Alexandra Aubry, Claudine Mayer. Structural and Biochemical Studies of the *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase C-Terminal Domain Classification: Biochemistry and chemical biology, TUBERCULOSIS 2012, Pasteur Institut, Paris.
  - Christine Bernard, Nicolas Veziris, Florence Brossier, Wladimir Sougakoff, Vincent Jarlier, Jérôme Robert, Alexandra Aubry. Systematic Analysis of *gyrA* and *gyrB* Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Help in Designing a Reliable Strategy for Fluoroquinolone Resistance Diagnosis Classification: Mycobacterial resistance and the need for new drug targets. TUBERCULOSIS 2012, Pasteur Institut, Paris
  - Alix Pantel, Stephanie Petrella, Nicolas Veziris, Vincent Jarlier, Hélène Ferrand, Claudine Mayer, Alexandra Aubry. How Compensatory *gyrA* Mutations Restoring Fluoroquinolone Susceptibility Change the Classification of Clinical *M. tuberculosis* Strains from XDR to MDR. Classification: Mycobacterial resistance and the need for new drug targets., TUBERCULOSIS 2012, Pasteur Institut, Paris
  - Aurélie Fillon, Alexandra Aubry, Vincent Jarlier, Nicolas Veziris. Moxifloxacin Should be Used for the Treatment of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: an Answer from a Murine Model. TUBERCULOSIS 2012, Pasteur Institut, Paris
  - Brossier F, Adeyema K, Veziris N, Jarlier V, Sougakoff W. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethambutol in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. Poster. Tuberculosis 2012, Institut Pasteur, Paris, 11-15 septembre 2012.
  - Fangous MS, Robert J, Brossier F, Sola C, Millot G, Veziris N, Jarlier V, Sougakoff W. Investigation by polyphasic molecular typing of the structure population of *Mycobacterium tuberculosis* strains in France. Pasteur. Tuberculosis 2012, Institut Pasteur, Paris, 11-15 septembre 2012.
  - Mougari F., Raskine L., Ferroni A., Marcon E., Sermet-Gaudelus I., Cambau E. Evaluation of semi-automated rep-PCR for clonality analysis of strains from the Mycobacterium abscessus complex 33<sup>rd</sup> Congress of the European Society of Mycobacteriology, July 2012, Brasov, Roumanie

## 7.6. Conférences sur invitations nationales

### Vincent JARLIER

Jarlier V. Tuberculose MDR-XDR. 32<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 22-23 novembre 2012.

### Nicolas VEZIRIS

- Veziris N. Les différentes mycobactéries atypiques pathogènes. 16<sup>ème</sup> congrès de pneumologie de langue



- française. Lille. 2012.
- Veziris N., Fournier A. Particularités des enquêtes autour des cas index MDR. Réunion « Prise en charge de la tuberculose à Paris », Paris, 2012
  - Veziris N. Développement de nouveaux traitements antituberculeux. Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, Paris, 2012
  - Veziris N. Quel traitement pour les infections à *M. tuberculosis* MDR en 2012 ? Service de Maladies Infectieuses et Tropicales. Lyon, 2012
  - Veziris N. Tuberculose à bacilles multirésistants. Service de Médecine Interne. Cochin, Paris, 2012

## 7.7. Conférences sur invitations internationales

### **Emmanuelle CAMBAU**

Cambau E. Educational Workshop: The basis in tuberculosis diagnosis and management of cases. 22<sup>nd</sup> ECCMID; Londres Avril 2012.

### **Vincent JARLIER**

- Jarlier V. Automated Drug susceptibility tests. 22<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, UK. 31 Mars-3 Avril 2012.
- Jarlier V. Diagnosis of tuberculosis. Asian Pacific Congress. Pekin. Novembre 2012
- Jarlier V. Resistance in tuberculosis. 2<sup>nd</sup> Sino-French Symposium on infectious diseases. Wuhan, Chine. Novembre 2012



## 8. Programme d'activité 2013 - 2014

### 8.1. Développer et évaluer les nouvelles techniques de diagnostic de la maladie et de l'infection tuberculeuse ainsi que le diagnostic des infections à mycobactéries atypiques et à mycobactéries dites rares

#### Diagnostic de la tuberculose

Notre projet soumis en 2011 à la campagne Stratégies Innovantes et Couteuses (STIC) 2012 et visant à évaluer l'apport de l'usage systématique d'un nouveau test moléculaire, Cepheid Xpert®MTB/RIF, pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire, qui avait reçu un avis favorable à l'étape de la lettre d'intention, n'a finalement pas été financé.

Sur la base des critiques favorable et constructives du jury qui nous a conseillé de resoumettre, nous avons modifié puis envoyé à nouveau le projet fin 2012 pour l'appel d'offre 2013, sous le titre :

**« Evaluation médico-économique d'une stratégie de diagnostic de la tuberculose maladie par l'utilisation systématique d'un test moléculaire rapide », comme suit :**

Bases rationnelles : les techniques innovantes sont basées sur l'amplification de gènes permettant de détecter la présence de *M. tuberculosis* complex ainsi que celui de leur résistance aux principaux antituberculeux. Le test Xpert MTB/RIF® (Cepheid) permet en un nombre limité de manipulations très simples d'obtenir un résultat en environ deux heures. Son principe est d'amplifier par une méthode de PCR en temps réel très sensible, directement dans un prélèvement respiratoire, une séquence du gène *rpoB* spécifique du complexe *M. tuberculosis* et de détecter en même temps les mutations de la région du gène *rpoB* qui déterminent la résistance à la rifampicine. Ce test permet donc simultanément d'établir un diagnostic positif de présence de *M. tuberculosis* complex, et un diagnostic de résistance à la rifampicine. Ce test limite les manipulations de laboratoire et donc les risques de contamination du personnel technique et des contaminations croisées entre prélèvements et donc le risque de faux positifs.

L'objectif est de quantifier l'impact médico-économique de l'utilisation systématique du test Xpert®MTB/RIF sur le délai de mise en route d'un traitement antituberculeux adapté chez les patients ayant une tuberculose pulmonaire.

L'étude sera prospective et divisée en deux périodes :

- une période dite « période sans-test » durant laquelle sera menée une étude de cohorte observationnelle, multicentrique avec recueil des cas incidents sur 1 mois et des informations sur leur prise en charge après diagnostic conventionnel
- une période dite « période avec test » durant laquelle sera menée une étude de cohorte multicentrique prospective de type « soins courants » avec recueil des cas incidents sur 1 mois pendant laquelle sera utilisée systématiquement la technique innovante pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

L'étude reposera sur des équipes de cliniciens et de microbiologistes très impliqués dans la tuberculose dans leur



établissement, associé au CNR-MyRMA qui a l'expertise des tests. Les centres participants sont choisis parmi ceux qui reçoivent le plus de cas suspects de tuberculose pulmonaire (de 300 à 2 000 cas par an chacun) parmi lesquels seulement 5 à 10% sont des cas avérés. Les centres seront randomisés pour commencer par l'une ou l'autre des périodes.

On estimera le coût de la stratégie diagnostique avec l'ensemble des examens bactériologiques et des tests de sensibilité, 1) par patient suspect de tuberculose, 2) par patient ayant un diagnostic confirmé de tuberculose et 3) par patient ayant une tuberculose résistante. On estimera également l'efficacité du diagnostic rapide en calculant le coût par jour de mise au traitement gagné.

## Prise en charge des cas de tuberculose MDR-XDR

Le nombre de souches du complexe *M.tuberculosis* MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA sera suivi régulièrement (ex. tous les trimestres) pour évaluer la charge de travail (antibiogrammes de 2<sup>nd</sup> ligne, recherche de mutations conférant la résistance, géotypage...). En cas d'augmentation, nous prendrons contact avec l'InVS et la Direction Générale de la Santé pour faire part des caractéristiques des cas en augmentation (pays d'origine, suspicion de cas groupés...) et des éventuels besoins nécessaires pour mener à bien le travail.

## Typage moléculaire des mycobactéries atypiques

Nous évaluerons pour *M.chelonae* la même méthode de REP-PCR standardisée (trousse DIVERSILAB® de bioMérieux) que nous avons évalué en 2011-12 pour *M.abscessus* (cf section 2).

## Etude du comportement in vitro des mycobactéries vis-à-vis des antimycobactériens

Nous poursuivrons le projet initié en 2012 pour mettre au point une nouvelle méthode pour tester la sensibilité des mycobactéries aux antituberculeux, en particulier *M.tuberculosis*. Cette méthode combine, d'une part, l'automate MGIT960 de culture en milieu liquide commercialisé par Becton-Dickinson et, d'autre part, un logiciel informatique récemment développé par la même firme et appelé Epicenter®TBeXiST (Tuberculosis - extended individual susceptibility testing). La combinaison de MGIT960 et de Epicenter®TBeXiST permet d'analyser, lors d'une même expérience, deux paramètres essentiels du test de sensibilité aux antituberculeux, (a) la mesure des proportions de mutants résistants et (b) la mesure des concentrations minimales inhibitrices. De plus, le logiciel permet une vision dynamique de la croissance bactérienne en présence d'antituberculeux puisque les index de croissance sont enregistrés plusieurs fois par jour jusqu'à positivité des témoins.

L'étude multicentrique initiée par le CNR-MyRMA (Emmanuelle Cambau) et le CNR des mycobactéries de Suisse (Pr Erik Boettger) et la firme Becton-Dickinson, et impliquant plusieurs laboratoires européens spécialisés dans l'étude des mycobactéries (Belgique, Portugal, Italie, Allemagne, Espagne, Pays-bas, Suède) qui repose sur le même protocole (mêmes concentrations d'antibiotiques, mêmes antibiotiques testés, mêmes inoculums de *M.tuberculosis*) et comparant les résultats obtenus avec ceux des méthodes de référence et des géotypes de résistance s'achèvera en 2013. 4 réunions du comité de pilotage (E ; cambau, E. bottger, M. Viveiros) et 2 réunions du groupe de travail ont eu lieu en 2012.



## 8.2. Activités de Surveillance

### Tuberculose

#### Méningite tuberculeuse

Le projet de surveillance des méningites tuberculeuses à culture positive se poursuit avec la surveillance des cas à culture positive de l'année 2011 des enfants de moins de 5 ans (enquête annuelle)

#### Protocole de recherche clinique méningites

Le CNR-MyRMA (Emmanuelle Cambau) participera au PHRC régional « Cohorte nationale observationnelle des méningites bactériennes communautaires de l'adulte » (responsable Xavier Duval, hôpital Bichat) qui recensera les méningites bactériennes en France et évaluera leur évolution.

#### Etude de la prise en charge et le suivi des tuberculoses multirésistantes en France

L'objectif est de suivre et documenter le devenir des personnes atteintes de tuberculose à bacilles multirésistants (TB MDR) en France pour améliorer les missions de conseil en antibiothérapie lors des réunions du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » du CNR MyRMA. Il s'agira d'enregistrer les modalités de prise en charge, de réunir les informations cliniques, bactériologiques, génomiques recensées jusqu'à l'issue de leur traitement et enfin les informations sur le devenir des patients durant deux ans après le début du traitement. L'étude s'efforcera d'intégrer la cohorte de patients déjà prise en charge par le biais des réunions du Groupe thérapeutique.

Pour cela, il sera nécessaire de développer d'un système de gestion de l'information des dossiers de chaque cas de TB MDR, robuste, simple et confidentiel adapté à l'enregistrement et au suivi des données cliniques, biologiques, thérapeutiques, incluant la tolérance aux traitements des tuberculoses MDR en France. Un accès selon différents niveaux de droits permettra une utilisation sécurisée en ligne par différents utilisateurs (coordination de l'étude, conseil en antibiothérapie, responsables des soins, laboratoire, enquêteurs épidémiologiques).

Ce projet a reçu l'appui de la DGS et un financement partiel pour la 1<sup>ère</sup> année de travail.

### Lèpre

Nous poursuivrons le programme que nous avons initié en 2012 d'appuis au diagnostic des cas de lèpre (microscopie et tests moléculaires d'identification de *M.leprae* et de résistance aux antilépreux : dapsons, rifampicine, quinolones) vus à Mayotte sera poursuivi en collaboration avec l'ARS et le dispensaire de léprologie de Mamoudzou (responsable Dr Anne-Marie de Montera, Médecin léprologue Dr Dalila Mohand-Oussaid). Nous tenterons de l'étendre à l'île d'Anjouan, toute proche de Mayotte, dont les émigrés constituent une population à haut risque à Mayotte.



### 8.3. Activités d'information, formation, conseils

#### Formation internationale dans les laboratoires du CNR-MyRMA en 2013

- Techniciens et biologistes du Centre national de référence de la tuberculose du Tadjikistan (financement ONI et Fondation Merieux)
- Biologiste responsable du laboratoire des mycobactéries de l'Institut Pasteur du Cambodge (Mme Sokleaph) de janvier à octobre 2013 (financement APHP)

#### Formation internationale lors de cours et congrès en 2013

- Cours européen de mycobactériologie organisé à Paris les 27 et 28 juin, par E. Cambau au nom de l'ESGMYC (ESCMID)
- Dans le cadre du groupe européen ESGMYC, le CNR participera à l'organisation de sessions lors du congrès de l'ESCMID en 2013 (Berlin, 27-30 mai 2013)

### 8.4. Travaux de recherche en lien avec l'activité du CNR

#### Etude structurale et fonctionnelle de l'ADN gyrase de *M. tuberculosis*

La sous unité GyrA de l'ADN gyrase (GyrA<sub>2</sub>GyrB<sub>2</sub>) contient le domaine de liaison-coupeure (DLC) et le domaine carboxy-terminal (CTD), alors que GyrB contient les domaines de l'ATPase et le domaine TOPRIM. TOPRIM et DLC interagissent pour former le site catalytique où se lie l'ADN et les quinolones. Nous avons récemment résolu la structure cristallographique du site catalytique de l'ADN gyrase *M. tuberculosis*.

Nous voulons améliorer la qualité du modèle de ce site catalytique et déterminant la structure du complexe ternaire site catalytique-ADN-quinolone par cristallographie aux rayons X. Ceci permettra d'élucider le rôle de nouvelles mutations dont l'implication dans la résistance aux quinolones est inconnue.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'action des quinolones FQ, nous utiliserons la technique dite « magnetic tweezers » qui permet d'étudier les interactions entre l'ADN et les protéines par micromanipulations de molécules isolées.

#### Etude structurale de l'ATP synthase de *M. tuberculosis*

La diarylquinoline (TMC207, bédaquiline) bloque la synthèse de l'ATP en inhibant l'ATP synthase, enzyme membranaire constituée de 2 domaines : catalytique (F1) et système de translocation des protons (Fo) qui contient un « rotor » mû par les protons (appelé C-ring) et dont la rotation permet la synthèse de l'ATP. La structure de l'ATP synthase des mycobactéries (ou ses unités) et les bases moléculaires de la liaison TMC-ATP synthase sont inconnues, même si les mutations conférant la résistance au TMC207 semblent concentrées dans une des sous-unités de l'ATP synthase.

La dernière étape sera de définir les conditions permettant l'expression et la purification de forme stable de l'enzyme. Nous déterminerons par microscopie électronique la structure à basse résolution et tenterons la cristallisation de l'ATP synthase, entière ou par sous-unités.

#### Développement de modèles permettant d'étudier les facteurs contribuant à la sélection de mutants résistants de *M. tuberculosis* in vivo

La plupart des modèles murins (swiss ou balb/C) ont été mis au point pour étudier l'activité des antituberculeux et sont caractérisés par l'absence de lésions granulomateuses, caractéristiques de la tuberculose humaine. Le modèle du singe macaque a permis de montrer que la sélection de mutants résistants était facilitée en phase latente qui est caractérisée par des lésions hypoxiques]. Nous voulons évaluer la contribution des lésions granulomateuses hypoxiques et plus généralement le statut immunitaire dans la sélection de mutants résistants chez la souris.

Nous utiliserons le modèle de la souris C3HeB/FeJ développé par Igor Kramnik, qui permet l'évolution vers des lésions granulomateuses hypoxiques après infection par *M. tuberculosis* (allèle récessif du chromosome 1,



appelé *sst1*. La fréquence et la diversité des mutants résistants sera comparée à celles obtenues avec le modèle balb/C et souris nue. Nous étudierons aussi la sélection of des mutants résistants chez des macrophages de souris déficiente CCR2 et des souris immunocompétentes.

**Evaluation de nouveaux schémas thérapeutiques dans la tuberculose MDR**

Nous poursuivons l'évaluation de nouveaux "boosters" de l'activation intracellulaire de l'éthionamide développés par A. BAULARD (Institut Pasteur, Lille) et de l'association carbapénème-clavulanate en collaboration avec M. ARTHUR (INSERM U872-team 12, CDR Cordeliers, Paris), en humanisant les posologies utilisées chez la souris.