



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-Virologie-Hygiène
Hôpital Henri Mondor
Responsable, Pr Emmanuelle CAMBAU

Résumé du rapport d'activité pour l'année 2007

Septembre 2008



Table des matières

1. INTRODUCTION.....	3
<i>Missions</i>	<i>3</i>
<i>Equipes.....</i>	<i>3</i>
<i>Locaux.....</i>	<i>3</i>
<i>Equipements.....</i>	<i>4</i>
<i>Démarche qualité</i>	<i>5</i>
<i>Résumé des activités de l'année</i>	<i>6</i>
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	8
2.1 CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	8
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2007.....	13
<i>Souches identifiées</i>	<i>13</i>
<i>Souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux.....</i>	<i>14</i>
<i>Détection de mutations impliquées dans la résistance de M. tuberculosis</i>	<i>15</i>
<i>Expertise en santé animale</i>	<i>17</i>
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	18
3.1. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	18
<i>Les réseaux de partenaires</i>	<i>18</i>
<i>Estimation de la couverture des réseaux ou représentativité, évolution</i>	<i>18</i>
<i>Analyse des caractéristiques du réseau CNR-MyRMA.....</i>	<i>19</i>
<i>Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS.....</i>	<i>20</i>
3.2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX.....	20
3.3. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX	23
3.4. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS	25
3.5. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	25
4. ALERTE	25
EPIDEMIE D'INFECTIONS CUTANÉES A MYCOBACTERIES ATYPIQUES APRES MESOTHERAPIE	25
5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	26
ENSEIGNEMENTS	26
FORMATIONS	26
GUIDES ELABORES (CONTENU, MODES DE DIFFUSION).....	27
RETRO-INFORMATION AUX PARTENAIRES.....	27
6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	28
RECHERCHES SUR LES MECANISMES DE RESISTANCE DES MYCOBACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES	28
<i>Résistance au pyrazinamide (PZA) chez M.tuberculosis</i>	<i>28</i>
<i>Etudes des mécanismes de résistance au R207910 chez M.tuberculosis.....</i>	<i>28</i>
<i>Etudes des mécanismes de résistance à l'isoniazide chez M.tuberculosis</i>	<i>29</i>
<i>Détection moléculaire de la résistance à la clarithromycine chez les mycobactéries atypiques.....</i>	<i>29</i>
<i>Etude du mécanisme de résistance aux fluoroquinolones</i>	<i>29</i>
CHIMIOThERAPIE EXPERIMENTALE	30
<i>Tuberculose.....</i>	<i>30</i>
<i>Ulcère de Buruli</i>	<i>31</i>
7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	31
PUBLICATIONS INTERNATIONALES	31
PUBLICATIONS NATIONALES.....	32
COMMUNICATIONS NATIONALES	32
COMMUNICATIONS INTERNATIONALES	32
CONFERENCE SUR INVITATIONS.....	33
8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2008-2009	33



1. Introduction

Missions

Les missions du CNR-MyRMA ont été définies par le cahier des charges 2005 :

- Contrôle de qualité des tests de sensibilité aux antituberculeux.
- Identification des souches de mycobactéries.
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de mycobactéries.
- Appui méthodologique pour la tuberculose multirésistante.
- Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques.
- Développement et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic.
- Surveillance de la résistance primaire et secondaire et de la multirésistance.
- Participation aux systèmes de surveillance européens.
- Surveillance de la méningite tuberculeuse et des mycobactérioses.
- Investigation des cas groupés et des épidémies (typage moléculaire).
- Alertes aux Autorités Sanitaires.
- Recherche appliquée : chimiothérapie expérimentale.
- Collaboration avec les laboratoires experts en santé animale.
- Information, formation.

Organisation et répartition des missions avec le laboratoire associé

L'organisation du CNR-MyRMA repose sur :

- un laboratoire coordinateur (Pitié-Salpêtrière, responsable Vincent Jarlier)
- un laboratoire associé (Henri-Mondor, responsable Emmanuelle Cambau)

Cette organisation permet (a) de mettre à profit des compétences complémentaires, plutôt axées sur la tuberculose, les antituberculeux et la surveillance épidémiologique au laboratoire coordinateur et plutôt sur la lèpre, les mycobactéries atypiques et l'environnement au laboratoire associé, et (b) de répartir certaines tâches et d'assurer la continuité du service.

Equipes

Les fonction, qualification, statut, domaine de compétence, ETP et organisme payeur des personnes impliquées dans le travail du CNR-MyRMA sont détaillées dans le tableau ci-joint.

Locaux

Laboratoire coordonateur : Laboratoire de Bactériologie-Hygiène 2^e étage du bâtiment de la Pharmacie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière. La superficie totale du laboratoire est de 1000 m².

Les activités se déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité P3 (150 m²) consacré à la mycobactériologie.



- dans les pièces adjacentes consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage...).

La gestion informatique des réseaux et bases de données, ainsi que l'animalerie de chimiothérapie expérimentale, sont localisées dans la partie universitaire du laboratoire, au 5^e étage de la Faculté de Médecine, située sur le même campus.

Laboratoire associé : Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, 1er sous-sol du bâtiment principal de l'hôpital Henri Mondor . La superficie totale du laboratoire est de 1500 m² et la partie du laboratoire utilisée pour l'étude des mycobactéries est de 150 m². Les activités se déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité (80 m²) consacré à la mycobactériologie.
- dans les pièces adjacentes (15 m²) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie)
- dans deux pièces (65 m²) consacrées à l'étude du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage?).
- La gestion informatique des réseaux et bases de données (système GLIMS) est le même que celui du reste du laboratoire.

Equipements

Laboratoire de sécurité P3 Pitié-Salpêtrière :

- équipements pour le traitement des prélèvements médicaux, cultures (milieux solides et liquides)
- équipements pour antibiogrammes cultures (milieux solides et liquides) et identification phénotypique
- 5 postes de sécurité microbiologique
- 6 incubateurs pour milieux solides et 1 automate de culture en milieu liquide (Bactalert)

Autres pièces du laboratoire Pitié-Salpêtrière:

- microscopes à fluorescence, microscopes classiques
- matériel d'hybridation/lecture Accuprobe (BioMérieux)
- extracteur d'acides nucléiques manuel LCx Vacuum System
- extracteur d'acide nucléique automatisé (pression négative) Roche MagNA Pure
- amplificateurs d'ADN classiques pour PCR
- amplificateur automatisé pour PCR en temps réel (Applied Biosystem)
- matériel d'hybridation manuel pour les bandelettes Innogenetics et Hain
- automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain
- séquenceurs ABI 310
- matériel pour génotypage par méthode RFLP
- matériel pour génotypage par champ pulsé Biorad CEF-DR2,
- imageur Biorad Chemidoc-XRS pour analyse des gels d'électrophorèse et des membranes d'hybridation
- spectrophotomètre pour quantification des acides nucléiques Pharmacia Gene Quant II
- système d'hybridation manuelle TwinCubator
- système Thermolab MRXII pour la recherche de *M. tuberculosis* par kit Amplicor Roche

Equipements accessibles sur la plate-forme génomique de la Pitié-Salpêtrière :

- microdosage des acides nucléiques sur spectrophotomètre NanodropNyxor,



- PCR temps réel haute capacité MX4000,
- séquenceur d'ADN Applied Biosystem 16 capillaires,
- équipement complet pour l'hybridation sur Microarrays (puces) : spotter Q assay pour la préparation des lames, stations manuelle et automatique d'hybridation, scanner Cy3/Cy5 pour la lecture des lames
- spectromètre de masse Maldi-tof.

Animalerie site Pitié-salpêtrière (capacité totale : 2000 à 2500 souris) :

- 4 isoteurs rigides en pression négative, 8 armoires-isoteurs conventionnelles, 4 isoteurs souples pour maintenance des animaux immunodéficients
- 2 postes de sécurité microbiologique pour les dissections et cultures
- étuves et autoclave pour destruction des déchets

Laboratoire associé Henri Mondor :

- équipement complet de mycobactériologie médicale (microscopie à fluorescence, culture...)
- matériel d'amplification par PCR Amplicor
- automate de culture en milieu liquide MGIT (Becton Dickinson)
- amplificateurs d'ADN classiques
- matériel d'hybridation/lecture Accuprobe (BioMérieux)
- matériel d'hybridation manuelle pour les bandelettes InnoLipa et Hain
- matériel pour génotypage par la méthode RFLP
- matériel pour génotypage par la méthode MIRU-VNTR

Démarche qualité

GBEA : le groupe de mycobactériologistes des CHU (« AZAY mycobactéries ») a rédigé un GBEA commun disponible sur le site azaymycobacteries.free.fr. Il comporte les chapitres suivants :

Mode opératoire : Préparation technique, Décontamination des prélèvements, Colorations et Examen microscopique, Culture des mycobactéries, Identification des mycobactéries, Hybridation par sondes nucléiques, Antibiogramme des mycobactéries, Résistance à la rifampicine, Amplification génique

Procédure : Les mycobactéries, Hygiène et Sécurité, Contrôle de Qualité, Elimination des déchets, Biologie Moléculaire, Souchothèque

Procédure annexe : Prélèvements

Participation du CNR au contrôle de qualité externe organisé par l'OMS

L'OMS organise pour les laboratoires nationaux de référence européens un contrôle de qualité externe des tests de sensibilité aux antituberculeux tous les 3 ans environ (dernier contrôle en 2004, cf rapports 2005 et 2006). Un lot de 20 souches de *M.tuberculosis* nous a été adressé en mars 2007 par la Health Protection Agency (précédemment Public Health Laboratory Service). Nos résultats ont été envoyés en Août 2007 à la HPA.

Contrôle de qualité externe organisé par le CNR pour le réseau Azay-mycobactéries

Dans le cadre de l'enquête sur la résistance primaire et secondaire effectuée chaque année par les laboratoires du groupe Azay-mycobactéries (cf plus loin), il a été décidé en 2003 d'organiser un contrôle qualité externe tous les 2 ans, ce qui a été fait en 2003 et en 2005. Les résultats étaient satisfaisants en 2003 et très satisfaisants en 2005. Un nouveau contrôle de qualité a été organisé en 2007.

Organisation du contrôle de qualité externe 2007

Le CNR a préparé 6 souches de référence : H37RV normalement sensible, ATCC 35827 mono-résistante à l'éthambutol et 4 souches cliniques caractérisées phénotypiquement et génotypiquement dont 3 mono-



résistantes à la rifampicine, l'isoniazide (haut niveau) ou la streptomycine et 1 souche résistante à l'isoniazide (bas niveau) et la streptomycine.

A partir de chacune des 6 souches, 16 duplicata ont été préparés sur milieu de Lowenstein-Jensen soit un total de 96 souches. 3 souches choisies au hasard ont été envoyées à chaque laboratoire du réseau en mai 2007.

Au cours de l'été les laboratoires ont effectué les tests de sensibilité à l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et la streptomycine selon leur méthode habituelle. De juin à octobre 2007 les résultats des tests ont été adressés au CNR qui les a analysés de la manière suivante :

Résultats

31 laboratoires sur 32 ont répondu, une souche n'a pas donné de subculture dans l'un des 30 laboratoires. Nous avons donc reçu 368 résultats sur 372 attendus soit un taux de réponse de 96,8%.

Les méthodes utilisées par les laboratoires pour les tests de sensibilité étaient la méthode des proportions sur milieu solide L.Jensen Biorad (5), Mérieux (1) ou préparé localement (1), sur milieux liquides Bactec 960 (18), MGIT manuel (3) ou Bact/Alert (3).

Isoniazide : sur les 96 souches distribuées, 35 étaient résistantes à l'isoniazide (17 haut niveau et 18 bas niveau) et 61 sensibles. Il y a eu 4 non réponses (3 souches sensibles et 1 mono résistante) mais aucun résultats faux résistant ou faux sensible.

Sensibilité, Spécificité et Efficacité = 100%.

Rifampicine : sur 96 souches distribuées, 19 étaient résistantes à la rifampicine et 77 sensibles. Il y a eu 4 non réponses (3 sensibles et 1 résistante), 1 résultat faux résistant (milieu MGIT), mais pas de faux sensible.

Sensibilité = $18/18 = 100\%$; Spécificité = $74/74 + 1 = 98,6\%$; Efficacité = $92/92 + 1 = 98,9\%$.

Ethambutol : sur 96 souches distribuées, 13 étaient résistantes à l'éthambutol et 83 sensibles. Il y a eu 4 non réponses (4 sensibles), 2 résultats faux résistants (milieu MGIT), mais aucun faux sensible.

Sensibilité = $13/13 = 100$; Spécificité = $79/79 + 2 = 97,5\%$; Efficacité = $92/92 + 2 = 97,9\%$.

Streptomycine : sur 96 souches distribuées, 35 étaient résistantes à la streptomycine et 61 sensibles. Il y a eu 4 non réponses (3 sensibles, et 1 mono résistante), 1 résultat faux sensible (milieu BacT/Alert) mais pas de faux résistant.

Sensibilité : $34/34 + 1 = 97,1\%$; Spécificité : $58/58 = 100\%$; Efficacité : $92/92 + 1 = 98,9\%$.

Les résultats du contrôle de qualité 2007 des antibiogrammes de *M. tuberculosis* organisé au sein du réseau AZAY-mycobactéries, sont parfaits pour l'isoniazide et de très bonne qualité pour la rifampicine, l'éthambutol et la streptomycine. Par rapport aux précédents contrôles, on peut noter que la bonne qualité des résultats pour la rifampicine et l'éthambutol est maintenue, que l'amélioration observée pour la streptomycine est maintenue et que les résultats sont en progrès pour l'isoniazide. Ces résultats sont très bons comparés aux normes de l'OMS.

Résumé des activités de l'année

L'activité d'expertise a continué à augmenter en 2007 (1062 souches et prélèvements soit + 100% par rapport à 2005 et +16 % par rapport à 2006) en raison du transfert de l'activité du CNR des mycobactéries localisé jusqu'en 2006 à l'Institut Pasteur de Paris. Il faut noter :

- la prédominance de *Mycobacterium tuberculosis* (n=370)
- un nombre de souches de *Mycobacterium bovis* inférieur à 10 cas/an montrant que la source animale de bacilles est très faible en France
- l'importance au sein des mycobactéries atypiques responsables d'infections (mycobactérioses), de *M.avium* (infections respiratoires, adénites), de *M.xenopi* (infections respiratoires) et des espèces à croissance rapide : *M.fortuitum* et *M.abscessus* (infections respiratoires) et *M.chelonae* (infections cutanées, parfois iatrogènes).

Sur le plan des **techniques d'identification**, l'année 2007 a été marquée par l'extension de l'utilisation des méthodes génétiques (amplification génique suivie d'hybridation sur sonde ou de séquençage) qui se substituent en grande partie aux méthodes phénotypiques, longues et difficiles, dont la maîtrise est cependant maintenue.



En matière de **tests de sensibilité aux antibiotiques** pour *M.tuberculosis*, il faut noter (a) la forte proportion (48 % en 2007) des souches reçues qui sont résistantes à au moins un antituberculeux de 1^{re} ligne et (b) le nombre de souches MDR (n=38 en 2007) qui représentent, sur la base des années 2005 et 2006, au moins 90% du nombre de cas MDR identifiés en France à travers le réseau CNR-MyRMA (cf ci-après).

Le nombre de souches MDR reçues, qui avait augmenté de 2001 à 2003, était resté stable (environ 60/an) en 2004 et 2005, tend à diminuer depuis : 51 en 2006 et 38 en 2007, en cohérence avec les données de la surveillance des cas MDR par le réseau CNR-MyRMA. Le nombre de cas ultrarésistants (XDR) est resté stable, de 1 ou 2 cas par an depuis 2002 et représente 2 à 5% du nombre des cas MDR.

La **détection moléculaire rapide de la résistance** de *M.tuberculosis*, basée sur la recherche des mutations qui déterminent la résistance aux antituberculeux est maintenant systématique pour la rifampicine (marqueur de multirésistance), le pyrazinamide (difficulté de mesurer in vitro la sensibilité à cet antibiotique pour des raisons techniques) et les fluoroquinolones (antibiotiques essentiels de la tuberculose MDR). Pour l'isoniazide le CNRMyRMA a mis en place en routine un nouveau test étendant le nombre des séquences cibles pour augmenter les performances de la détection moléculaire de la résistance à cet antibiotique qui atteint maintenant 88%. Les activités 2007 ont par ailleurs confirmé la rareté de la résistance acquise chez les mycobactéries atypiques.

En matière **d'évaluation des outils diagnostiques**, le CNR-MyRMA a en 2007 (a) évalué la nouvelle trousse Genotype MTBDR *plus*® qui améliore la détection des souches résistantes à l'isoniazide (de 70 à 88 %), surtout des souches de bas niveau de résistance (17 à 69 %), (b) évalué la nouvelle technique BioRad Real Time TB Assay® d'amplification génique (TAG) pour le diagnostic de la tuberculose, basée sur l'amplification « en temps réel », et montré que cette technique est un peu plus sensible que les techniques disponibles jusqu'ici, (c) entrepris la mise au point d'une trousse de détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques antilépreux, (d) lancé un programme de mise au point méthodologique pour rechercher les mycobactéries atypiques dans l'environnement hydrique (espèces impliquées dans des infections humaines nosocomiales, cutanées après inoculation, pulmonaires ou généralisées chez le sujet immunodéprimé) dans le cadre de PIRENSEINE (Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine).

Le CNR-MyRMA poursuivi en 2007 **l'appui méthodologique pour les cas de tuberculose multirésistante (MDR)** avérés ou suspectés : (a) tests de détection moléculaire rapide directement à partir des prélèvements suspects pour confirmer/infirmier la multirésistance, (b) batterie de tests moléculaire à partir des souches pour identifier les gènes impliqués dans la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide, et donner une première orientation en matière de sensibilité au pyrazinamide et aux fluoroquinolones, (c) tests de sensibilité in vitro aux antibiotiques de 2^e ligne qui nécessitent la fabrication et les contrôles de milieux de culture non disponibles dans le commerce (éthionamide, amikacine, fluoroquinolones...) (d) conseils thérapeutiques basés sur les données bactériologiques pour chacun des cas et, dans les cas les plus difficiles (très peu d'antibiotiques actifs, terrain particulier...) discussion du dossier dans le cadre du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes », groupe multidisciplinaire qui se réunit tous les 2 mois.

En matière **d'investigation des cas groupés et d'épidémies**, le CNR-MyRMA assure le génotypage des souches de *M. tuberculosis* par la technique de référence (RFLP) et une méthode plus rapide (MIRU-VNTR). Les résultats du travail 2007 (221 souches) a permis : (a) de confirmer 9 des 22 épisodes de transmission en collectivité suspectés lors d'enquêtes autour des cas (b) dans le cadre de l'étude systématique des cas de tuberculose chez les SDF et les migrants hébergés dans les foyers parisiens menée depuis 1994 avec la DASES, de rattacher une partie des cas inclus en 2007 à des grappes de déjà identifiées les années précédentes, (c) de montrer qu'il n'y avait pas eu d'épidémie de tuberculose MDR en 2007.

En matière de **surveillance et d'alertes**, le CNR- MyRMA a poursuivi ses activités (a) sur la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux de 1^{re} ligne stratifiés selon les critères de l'OMS (pays de naissance, antécédents de traitement) à travers le réseau Azay-Mycobactéries (33 CHU, 1500 cas de tuberculose à culture positive par an, soit 1/3 de l'ensemble des cas à culture positive de France) et montré que le taux de résistance primaire a été globalement de 8,9% (5,8% chez les malades nés en France et 11,2% chez ceux nés à l'étranger, p<0,01) et respectivement de 5,9% (3,2% et 8 % p<0,01) pour l'isoniazide et 1,4% (0,2% et 2,2%, p<0,01) pour la rifampicine, (b) sur la multirésistance à travers le réseau d'environ 300 laboratoires mis sur pied par le CNR-MyRMA et montré (a) que la proportion de cas MDR était en 2006 (n=55) était de 1,3%, chiffre inchangé depuis 2002 et que (b) les malades concernés



sont jeunes (âge médian 34 ans), le plus souvent nés à l'étranger (74%) et sans antécédent de traitement (multirésistance « primaire » 67%).

L'alerte la plus importante a concerné une épidémie d'infections sous cutanées iatrogènes succédant à des actes de mésothérapie en pratique libérale (16 cas dont 12 documentés à *M.chelonae* ou *M.frederiksbergense*), mené avec le C-CLIN Paris-nord, la DDASS de Paris et la CIRE Ile de France.

En matière **d'étude des mécanismes de résistance**, le travail mené s'est focalisé sur les fluoroquinolones, l'isoniazide, le pyrazinamide, les diarylquinolines (antibiotiques en développement).

En matière de **recherche thérapeutique**, nous avons en 2007 (a) poursuivi l'évaluation de l'activité in vivo des diarylquinolines dans la tuberculose murine en se focalisant (1) sur la mesure de l'activité bactéricide précoce (pour mimer le « early bactericidal activity » chez l'homme) et (2) sur l'activité durant la 2^{ème} phase du traitement de la tuberculose murine (pour mimer la phase dite de « continuation » sur les bacilles persistants), (b) évalué l'activité résiduelle de la moxifloxacine in vivo sur les souches de *M.tuberculosis* résistantes à l'ofloxacine et (c) évalué l'efficacité in vivo de traitements entièrement oraux à base de rifampicine (ou rifapentine), clarithromycine et moxifloxacine.

2. Activités d'expertise

2.1 Capacités techniques du CNR

Liste des techniques disponibles

Techniques de diagnostic

- Microscopie
- Cultures en milieux solides et liquides (cf équipement)
- amplification génique (cf équipement)

Techniques d'identification

- Techniques phénotypiques classiques (caractères cultureux, morphologiques et biochimiques)
- Hybridation génomique directe (Accuprobe)
- hybridations génomique après amplification (bandelettes Genotype MTBDR®, Genotype MTBC®, Genotype CM®, Genotype AS®....)

Techniques d'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

- Antibiogrammes par la méthode de référence (méthode des proportions) sur milieu de Löwenstein-Jensen pour *M.tuberculosis*. Les milieux pour tester la sensibilité aux antibiotiques de 2^{ème} ligne (kanamycine, amikacine, capréomycine, fluoroquinolones, thioamides, cyclosérine, PAS, linézolide et thiactazone) n'étant plus commercialisés, ils sont préparés et contrôlés au laboratoire.
- Méthode des proportions pour *M.kansasii*, sur milieu 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 (auquel *M. kansasii* est naturellement résistant).
- Détermination des CMI en milieu de L.Jensen (clarithromycine, fluoroquinolones, éthambutol, rifabutine. Les milieux, non disponibles dans le commerce, sont préparés et contrôlés au laboratoire.
- Détermination des CMI avec des bandelettes E-test ou par dilution en milieu liquide sur microplaque (Trek®) pour les mycobactéries à croissance rapide.
- Pour *M. leprae* : inoculation dans le coussinet plantaire la souris 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.
- Amplification génique et hybridation sur bandelette Genotype MTBDR® pour la détection des mutations causant la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide.

Amplification et séquençage des gènes impliqués dans la résistance acquise : *rpoB*, *katG*, *inhA*, région régulatrice *inhA*, *pncA*, *gyrA*, *gyrB*, ARN 23s, *folP*

Techniques de typage-marqueurs épidémiologiques

- pour *M.tuberculosis* :
- . RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)



. MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units Variable Number Tandem Repeat) 12 ou 24 loci

- Pour les **mycobactéries atypiques** : électrophorèse en champ pulsé

Techniques d'évaluation de l'activité de nouveaux antibiotiques

Méthodes in vitro classiques : CMI, étude de la bactéricidie.

Méthodes in vivo : modèles de chimiothérapie expérimentales chez la souris pour *M.tuberculosis*, *M.leprae*, *M.ulcerans*, *M.avium*.

Techniques développées en 2007

L'amplification génique et hybridation sur bandelette Genotype MTBDR® pour la détection des mutations causant la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide a été introduite en 2007 en raison de ses meilleures performances pour détecter la résistance à l'isoniazide.

La détermination des empreintes digitales génomiques de l'espèce *M. chelonae* par électrophorèse en champ pulsé a été mise au point en 2007 à l'occasion de l'épidémie de cas d'infections à cette bactérie succédant à des actes de mésothérapie (cf section 4).

Techniques en développement : principes et état d'avancement

Mise au point d'une trousse pour la détection moléculaire lépromes de la résistance aux antibiotiques antilépreux à partir des

Pour standardiser la détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques antilépreux (sulfamides, rifampicine, fluoroquinolones) qui est aujourd'hui manuelle, afin de pouvoir en transférer la technologie vers les pays où sont les malades, nous avons engagé en 2007 un programme de mise au point d'une trousse d'hybridation sur bandelette mené en collaboration avec les Laboratoires Hain et l'Ordre de Malte. L'approche méthodologique est l'amplification des séquences cibles des gènes où sont localisées les mutations conférant la résistance puis hybridation avec des sondes placées sur une bandelette de nitro-cellulose.

Les étapes menées à bien en 2007 ont été :

- recensement de toutes les mutations associées à la résistance à la rifampicine, aux quinolones et aux sulfamides chez *M.leprae*,
- vérification par des tests enzymatiques que les mutations de GyrA décrites entraînent bien la résistance aux quinolones
- préparation d'une collection d'extraits d'ADN de *M.leprae* à partir de lépromes reçus au CNR-MyRMA dans le cadre des activités d'expertise
- la mise au point des protocoles techniques pour l'amplification génique : choix des amorces, conditions de PCR multiplex
- mise au point des sondes d'hybridation pour les séquences cibles sous leur forme sauvage : 4 sondes pour *rpoB* (résistance à la rifampicine), une pour *gyrA* (résistance aux quinolones) et une pour *folP* (résistance aux sulfamides)
- mise au point des sondes d'hybridation pour les séquences cibles sous leur forme mutées résistantes : 2 sondes pour *rpoB* (H11s26Tyr, Ser531Leu), une pour *gyrA* (Ala91Val) et une pour *folP* (Pro55Leu, Thr53Ala)
- mise au point de sondes pour l'identification de *M.leprae* : séquences conservées de *rpoB* et *folP*.

Technique de recherche de mycobactéries atypiques dans l'eau

Les mycobactéries atypiques ou non tuberculeuses (NTM) sont régulièrement impliquées dans des infections humaines : (a) nosocomiales en général iatrogènes (liées à des injections, chirurgie, dispositifs intra-vasculaires), (b) infections cutanées d'inoculation, (c) infections pulmonaires et (d) infections généralisées chez le sujet immunodéprimé.

Beaucoup d'espèces de NTM sont présentes dans l'environnement et en particulier dans les environnements aquatiques, dont les eaux douces. L'écologie des NTM est encore mal connue, et on ignore en particulier quels sont leurs réservoirs principaux. Les animaux et les biofilms pourraient en être des réservoirs ou des vecteurs. Les NTM et les légionelles sont présents dans les mêmes systèmes de distribution d'eau et interagissent avec les protozoaires (amibes) et les biofilms. Mais les informations concernant la présence des NTM dans l'eau urbaine, les systèmes de distribution d'eau potable et les systèmes de distribution d'eau chaude sont parcellaires. Il n'y a pas de méthode standardisée pour la détection des NTM dans l'eau.

Selon l'OMS et la directive cadre européenne 98/83/CE, l'eau potable ne devrait comporter aucun



microorganisme pathogène à des concentrations susceptibles d'affecter la santé humaine. Cependant ces normes ne prennent pas en compte des pathogènes émergents comme les NTM. La DG24 de la CE pointe le besoin d'intensifier la recherche sur les NTM en Europe, en particulier concernant (a) les méthodes de détection des NTM dans l'environnement, (b) l'identification des sources de contamination et des réservoirs environnementaux, (c) la diversité des NTM dans ces environnements, (d) l'identification de marqueurs de virulence et (e) le développement de stratégies de désinfections efficaces.

C'est pourquoi le CNR-MyRMA s'est engagé en 2007 dans un programme de recherche appliquée visant à identifier les sources et réservoirs des NTM et à suivre la dynamique temporelle des NTM dans le bassin versant de la Seine. Ce projet, appelé AQUAMYC, est mené en collaboration avec le Centre d'enseignement et de recherche Eau Ville Environnement (CEREVE) de l'Université Paris 12 (Françoise Lucas), le Centre de recherche d'expertise et de contrôle des eaux de Paris (CRECEP) (Laurent Moulin, Sophie Haenn), et la Direction de la Recherche et Développement (SIAAP) (Alexandre Goncalvez) dans le cadre du Programme PIRENSEINE (Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine).

Le projet qui s'étendra sur au moins 4 ans (2007-10) s'articule en 4 axes :

- mise au point de techniques d'échantillonnage, de culture et de quantification dans l'eau
- identification des réservoirs de NTM dans l'eau et les sédiments du bassin de la Seine
- variabilité temporelle des taux de NTM dans l'eau et à l'interface air/eau en amont et aval de rejets de station d'épuration (STEP) au cours des intempéries
- effet du procédé de traitement des eaux dans les stations d'épuration.

En 2007, nous avons débuté la mise au point des techniques de détection, de culture et de quantification dans l'eau, en comparant des méthodes de mise en culture et de biologie moléculaire à partir d'eau artificiellement contaminée avec des NTM (*M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. avium*) et des bactéries de l'environnement (*Pseudomonas*, *Bacillus*).

Pour la culture, nous avons étudié le couplage de la filtration, employée habituellement pour les recherches bactériologiques dans l'eau (cf norme pour la quantification des légionelles) à une décontamination classique, selon les protocoles utilisés en mycobactériologie humaine ou environnementale. Le rendement a été mesuré en comparant le nombre de NTM introduit dans un litre d'eau au nombre de colonies obtenu après filtration et/ou décontamination.

Les premiers résultats ont montré que le rendement après filtration et sonication est au plus de 10% pour *M. chelonae* (90% de perte). Cette perte est due aux caractéristiques de la paroi des mycobactéries qui leur confère leur capacité à s'attacher aux surfaces hydrophobes telles que les membranes de filtration. Nous avons réussi à détacher les NTM de la membrane par agitation dans un détergent (SDS 0.4%) ce qui augmente le rendement de 10 à 50%.

Les protocoles de décontamination (CetylPyridinium, acide chlorhydrique soude) ont un effet décontaminant satisfaisant en présence de *P. aeruginosa* et de *Bacillus spp* mais entraînent une perte supplémentaire de 90 à 99% des NTM. Au total, le protocole de filtration-décontamination ne permet la récupération que de 5 à 10% des NTM des échantillons.

C'est pourquoi d'autres méthodes seront étudiées (ex. centrifugation et culture sur milieux sélectifs).

Ce travail a fait l'objet du mémoire de Master 2 de Laetitia Betelli, étudiante à l'Université de Versailles-Saint Quentin.

Collections de souches de référence

- Le CNR-MyRMA a préparé et entretenu une collection de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux. Dans le but d'éviter les échanges de souches multirésistantes, qui sont hautement dangereuses, les souches préparées sont monorésistantes (à l'isoniazide, 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.

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

- Les souches sont stockées congelées.



- Ces souches sont tenues à la disposition de tous les laboratoires et sont envoyées sur demande. Elles sont aussi utilisées pour les contrôles de qualité externes des réseaux (cf Démarche Qualité).

Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR

Liste existante :

- Microscopie à fluorescence
- Cultures en milieu solides et liquides
- Identification des cultures par sonde Accuprobe ou bandelettes Genotype
- Identification de *Mycobacterium tuberculosis* par amplification génique directement à partir des prélèvements uniquement si l'examen microscopique est positif
- Tests de sensibilité aux antibiotiques de première ligne 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...)
- Génotypage des souches de *M. tuberculosis* par RFLP ou MIRU-VNTR 15 à 24 loci

Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse :

Nouvelle trousse Genotype Mycobacterium MTBDR PLUS® (Hain) pour la co-détection rapide de mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* à la rifampicine et à l'isoniazide

La trousse Genotype MTBDR plus® (Hain) est la nouvelle version d'un kit destiné à la détection rapide de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide de *M. tuberculosis*. Elle est basée sur une hybridation sur bandelette d'amplicons des zones d'intérêt des gènes *rpoB* (ARN polymérase), *katG* (catalase-peroxydase) et du promoteur du gène *inhA* (enoyl-ACP reductase). Le test met en évidence certaines des mutations impliquées dans la résistance à la rifampicine (positions 505 et 533 dans RpoB) et à l'isoniazide (position 315 dans KatG impliquée dans la résistance à haut niveau à l'isoniazide ; positions -8, -15 et -16 dans le promoteur d'*inhA* impliquées dans la résistance à bas niveau à l'isoniazide).

Nous avons évalué les performances de la trousse Genotype MTBDR plus® en comparaison à ceux du séquençage complet des gènes *katG*, *inhA* et du promoteur du gène *inhA*. Nous avons ainsi montré que cette nouvelle version permet de détecter : (a) toutes les souches résistantes à la rifampicine (alors que pour toutes les souches sensibles le résultat est « absence de mutation ») et (b) significativement plus de souches résistantes à l'isoniazide que la version précédente (88 vs. 70%), en particulier plus de souches résistantes à bas niveau (69% vs. 17%). En revanche, la spécificité est très bonne puisque pour toutes les souches sensibles à l'isoniazide, le résultat du test est « absence de mutation ».

Afin de simuler les conséquences pratiques des performances du test en matière de résistance à l'isoniazide, nous avons pris 3 situations épidémiologiques réelles de résistance à cet antibiotique :

- celle des nouveaux malades nés en France (incidence de la résistance 1,8%)
- celle des nouveaux cas de Lettonie (incidence de la résistance 29%)
- celle des cas déjà traités d'une région de Russie (incidence de la résistance 70%)

Les résultats montrent (a) que la valeur prédictive négative du test est très bonne (>95%) tant que la prévalence de la résistance à l'isoniazide est inférieure à 20% mais chute au-delà et (b) que le nombre de cas de résistance à l'isoniazide non détectés par ce test parmi 100 cas de résistance est acceptable (<1/100) lorsque la prévalence de la résistance est < 5% mais est inacceptable lorsqu'elle est de 30% (n=4) et à plus forte raison de 70% (n=10).

Le nouveau kit Genotype MTBDR plus® est désormais utilisé en routine dans le cadre de l'aide à institution rapide du traitement antituberculeux, en particulier chez les malades les plus contagieux.

Techniques d'amplification génique de *M. tuberculosis* complex pour le diagnostic de la tuberculose (BioRad Real Time TB Assay ®)

Les tests d'amplification génique (TAG), qui consistent à amplifier et détecter une séquence nucléique spécifique de *M.tuberculosis* directement dans les prélèvements, offrent la possibilité théorique de raccourcir à quelques heures le délai du diagnostic de la tuberculose dans les prélèvements d'origine respiratoire. Lorsque l'examen microscopique est positif, les TAG sont efficaces pour affirmer la maladie tuberculeuse avec une très bonne valeur prédictive positive. En revanche, ils ne sont pas recommandés lorsque l'examen microscopique est négatif (VPP trop faible pour permettre une décision).



Une approche pour améliorer les performances des TAG est de faire appel aux techniques d'amplification « en temps réel » plus sensibles que les techniques PCR classiques. En 2006, nous avons entrepris l'évaluation d'un test d'amplification Biorad Real time TB Assay® pour amplification de la séquence d'insertion IS6110 et de la région RD9 du gène de *M.tuberculosis*. Les conclusions de cette première étude indiquaient une sensibilité du test de 90% pour l'ensemble (100% pour les échantillons M+ et 77% pour les échantillons M-) et une spécificité « brute » de 93%, résultats globalement très encourageants.

En 2007, la société Biorad a développé une nouvelle version du kit Real time TB appelée NAT RT TB® incluant de nouvelles sondes de détection. Dans un 1er temps, nous avons évalué la nouvelle version du kit à partir de 96 échantillons cliniques collectés en routine. Par rapport à la culture, le test NAT RT TB a permis l'identification de 16 des 17 prélèvements contenant *M. tuberculosis*. La sensibilité brute du test était donc de 94%. Point important, la sensibilité parmi les échantillons négatifs à l'examen microscopique mais positifs à la culture était de 86%.

Nous avons entrepris une évaluation sur une cohorte de malades M- mais hautement suspects de tuberculose. Le test a été positif pour IS6110 et/ou RD9 pour 20 des 34 échantillons M- à culture positive (59%) et négatif pour 171/182 échantillons à culture négative. Comparée à la culture (gold standard), la sensibilité « brute » du test lors de cette évaluation a donc été de 59% pour les échantillons M-, et la spécificité de 94%, avec une VPP de 64% et une VPN de 92%, compte tenu de la prévalence élevée (12%) de la tuberculose dans cette cohorte.

En conclusion, malgré les progrès techniques le test NAT RT TB® ne peut pas être recommandé lorsque l'examen microscopique des prélèvements est négatif, ce qui reste le cas dans une population présélectionnée de patients suspects de tuberculose, car la sensibilité et la VPP sont trop faibles malgré une spécificité convenable (94%), en raison de la prévalence faible de la tuberculose ($\leq 5\%$) chez les patients M- pour lesquels les cliniciens demandent la recherche de *M. tuberculosis*.



2.2 Activités d'expertise en 2007

Nombre de souches ou prélèvements réceptionnés

Au cours de l'année 2007 le CNR-MyRMA a reçu **911 souches et 151 prélèvements (total 1062)** pour identification et/ou typage moléculaire et/ou étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Parmi les **911 souches** reçues :

- 70 ont été classées (souches connues ou demandes inappropriées).
- 8 souches contaminées n'ont pu être étudiées
- 8 souches ont été identifiées comme des espèces non mycobactériennes
- **825 souches (90,5% des souches reçues) ont été soumises à identification** et, pour la plupart ont été aussi soumises à antibiogramme phénotypique et/ou à des tests génotypiques de détection de résistance et/ou à un génotypage pour enquête épidémiologique.

Parmi les **151 prélèvements** reçu pour mise en culture et/ou pour amplification génique :

- 11 ont été classés sans suite du fait d'une demande inadéquate.
- 80 prélèvements ont été mis en culture par méthode classique : 39 de ces 80 prélèvements (soit 49%) ont donné une culture positive à mycobactéries.
- 93 ont été soumis à diagnostic de tuberculose par amplification génique (PCR).

Souches identifiées

Les **825 souches identifiées** se répartissent en **370 souches du complexe *M.tuberculosis*** et **455 souches de mycobactéries atypiques**

Les souches proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et TOM-DOM (laboratoires hospitaliers, LABM...).

Parmi les **370 souches de *M. tuberculosis* complex**, toutes étaient de l'espèce *M.tuberculosis*, à l'exception de 8 souches de *M.bovis* var BCG, 9 souches de *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 10 souches de *M. africanum* (stable par rapport à 2006).

Parmi les **455 souches de mycobactéries atypiques** :

- **154 souches (35% du total) du complexe *M.avium*** (en 2006 n=176, 48 % du total). La proportion de ces souches considérées comme responsables d'infection (n=115 soit 75%) est élevée, en cohérence avec la volonté du CNR de concentrer ses efforts sur les souches importantes sur le plan médical.
- **69 souches de *M. xenopi*** (15% du total). L'ensemble de ces souches provenaient de sécrétions respiratoires (aucune ne provenait de prélèvements ostéo-articulaires). Parmi ces 69 souches, 43 (63%) ont été considérées comme responsables d'infection
- **72 souches d'espèces à croissance rapide** (16% du total): *M.chelonae*, *M. abscessus*, *M.fortuitum* ...dont 49 ont été considérées comme responsables d'infections (68%), le plus souvent pulmonaires dans le cadre de mucoviscidose pour *M.abscessus* et d'infections cutanées pour *M. chelonae* (en particulier dans le cadre de l'épidémie dite « de la mésothérapie »)
- **38 souches d'espèces non pathogènes**, qui correspondent à des souillures (8,6% du total) appartiennent en majorité à l'espèce *M. gordonae* (n=35, 8% du total). Cette faible proportion d'espèces non pathogènes est liée à l'orientation du CNR vers l'aide au diagnostic des infections à mycobactéries.
- **20 souches d'espèces rares nouvellement décrites** :
 - . 6 souches de *M.massiliense* (espèce proche de *M.abscessus* décrite en 2004) isolée de prélèvements respiratoires de 5 malades dont 3 atteints de mucoviscidose et d'un prélèvement d'épilon d'un malade qui avait une perforation gastrique suite à la pose d'un anneau gastrique. Dans tous ces cas, cette espèce a été considérée comme pathogène.
 - . 4 souches de *M.arupense* (espèce proche de *M.terrae* décrite en 2006) responsables d'une ténosynovite de la main ou du poignet dans 3 cas et considérée comme un contaminant d'un prélèvement respiratoire chez un 4ème patient.
 - . 4 souches de *M.frederikbergense*, isolées de 2 prélèvements cutanés dans le cadre de l'épidémie dite « de la mésothérapie », considérée comme contaminant dans un prélèvement respiratoire et isolée d'un prélèvement environnemental (eau souterraine).
 - . 3 souches de *M. bolletti* (espèce proche de *M. chelonae* décrite en 2006) isolées de 2 prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose et une d'un prélèvement d'environnement dans le cadre de l'épidémie dite « de la mésothérapie ».



. 1 souche de *M. kumamotonense* (espèce proche de *M. arupense* décrite en 2006) isolée d'un prélèvement respiratoire et considérée comme un contaminant.

. 1 souche de *M. houstonense* (espèce appartenant au complexe *M. fortuitum*, décrite en 2006) isolée d'une plaie de jambe suite à des travaux de jardinage.

. 1 souche de *M. salmoniphilum* (espèce proche de *M. chelonae*, décrite en 1960 et redécrite en 2007 habituellement responsable d'infection chez les poissons) isolée d'un prélèvement sanguin chez un patient séropositif pour le VIH.

Les espèces isolées des 39 cultures positives provenant des 93 prélèvements reçus (cf supra) étaient *M.tuberculosis* (28), *M.intracellulare* (4), *M.xenopi* (2), *M.abscessus* (3), *M. marinum* (1) et *M. chelonae* (1).

34 de ces 93 prélèvements (37%), presque tous positifs à l'examen microscopique (M+) ou provenant de malades fortement suspects de tuberculose, se sont révélés positifs pour la présence d'ADN de *M.tuberculosis* complex (PCR Amplicor).

Au total, il n'y a pas eu en 2007 d'augmentation du nombre de souches d'espèces de mycobactéries atypique particulière.

Souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux

451 souches ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques : 189 de bacilles de la tuberculose et 262 de mycobactéries atypiques.

1. bacilles de la tuberculose

189 souches de *M.tuberculosis* complex ont été reçues au CNR pour antibiogramme :

- 97 pour antibiogramme standard (antituberculeux de première ligne)

- 73 pour antibiogramme « complet », (antituberculeux de première ligne et antibiotiques de 2^{ème} ligne) :

38 souches connues pour être multirésistantes, 20 souches connues pour être résistantes au moins à l'isoniazide et 15 souches initialement suspectes de résistance ou isolées chez des patients présentant des intolérances médicamenteuses.

Résistance aux antibiotiques de 1^{ère} ligne :

- 52% étaient sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine.

- 48% étaient résistantes à au moins un des antibiotiques :

. 26% résistantes à au moins un de ces 4 antibiotique, mais non multirésistantes

. 22% (n=38) multirésistantes (MDR) c.a.d. résistantes à isoniazide et rifampicine

Remarques : 110 des souches testées provenaient de malades sans antécédent de traitement antituberculeux. Le taux de résistance primaire (malades sans antécédents de traitement) à au moins un antituberculeux de 1^{ère} ligne calculé sur l'effectif très particulier de ces 110 souches reçues par le CNR-MyRMA était en 2007 de 53%, chiffre très proche de celui de 2006 (44%) mais beaucoup plus élevés que celui mesuré par l'enquête annuelle menée à travers le réseau Azay-Mycobactéries (<10%), ce qui s'explique par le fait que les laboratoires nous adressent des souches pour tests de sensibilité en cas de résistance avérée ou suspectée.

Résistance aux antibiotiques de seconde ligne :

La sensibilité aux antibiotiques de seconde ligne a été testée sur 73 souches : 38 souches connues pour être multirésistantes et 35 connues pour être résistantes au moins à l'isoniazide ou 15 initialement suspectes de multirésistance.

Résultats pour les souches multirésistantes (n=38) :

Résistance à la streptomycine 2/3 des souches, à l'éthambutol 1/2 des souches, à l'éthionamide 1/2 des souches, au pyrazinamide 1/4 des souches, à la cyclosérine 15%, au PAS 10%, à au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 18%, aux fluoroquinolones 8 et finalement aux fluoroquinolones et à au moins un aminoside de réserve (définition de l'ultrarésistance ou **XDR**) 5%.

Le nombre de souches **MDR** reçues au CNR, qui avait augmenté de 2001 (n=29) à 2003 (n=60), est resté stable en 2004 (n=51) et 2005 (n=60) et a un peu diminué en 2006 (n=53) puis 2007 (n=38).

Le nombre de souches **XDR** reçues au CNR est resté de 1 ou 2 par an ces dernières années, leur proportion au sein des souches MDR ayant une petite tendance à l'augmentation (2% jusqu'en 2005, 4% en 2006 et 5% en 2007).

Résultats pour les souches « hors multirésistance » (n=35)

La résistance aux antituberculeux de 2^{ème} ligne était rare: aucune souche résistante aux fluoroquinolones, (à noter étant donné l'utilisation des fluoroquinolones pour le traitement d'infections respiratoires), 2 souches (6%) résistantes aux aminosides de réserve, 7 souches (20%) résistantes à l'éthionamide.

2. Mycobactéries atypiques



Souches

262 souches considérées comme responsables d'infection (mycobactérioses) : 114 *M. avium* complex, 43 *M. xenopi*, 21 *M. kansasii*, 25 *M. chelonae*, 24 *M. abscessus*, 6 *M. massiliense*, 4 *M. boletii*, 4 *M. simiae*, 3 *M. arupense*, 3 *M. szulgai*, 3 *M. scrofulaceum*, 2 *M. frederikbergense*, 2 *M. malmoense*, 1 *M. marinum*, 1 *M. mucogenicum*, 1 *M. triplex*, 1 *M. phocaicum*, 1 *M. interjectum*, 1 *M. kumamotoense*, 1 *M. lentiflavum*, 1 *M. chimerae*.

M. avium : 6 des 114 souches de *M. avium* complex (5%) étaient résistantes à la clarithromycine (CMI >8 mg/l). Les 6 souches provenaient de malades ayant déjà reçu des macrolides (5 avaient une mutation connue en position 2058 ou 2059 du gène qui code l'ARN 23S). Le taux de résistance secondaire à la clarithromycine, parmi les 21 malades ayant des antécédents de traitement par macrolides, était de 18%. Ce chiffre est stable par rapport à 2006 (23%) et cohérent avec les résultats des rares enquêtes systématiques effectuées jusqu'ici.

M. xenopi : aucune des 43 souches de *M. xenopi* n'était résistante à la clarithromycine (seulement 5% des 43 malades avaient des antécédents de traitement).

M. kansasii : aucune des 21 souches de *M. kansasii* isolées n'était résistantes (seulement 5% des 43 malades avaient des antécédents de traitement).

Espèces à croissance rapide : 2 des 25 souches de *M. chelonae*, isolées chez une même malade ayant reçu de la clarithromycine, étaient résistantes à la clarithromycine (CMI >32 mg/l). Ces deux souches portaient une même mutation en position 2059 du gène qui code l'ARN23S, bien connue pour entraîner la résistance à la clarithromycine. Aucune des 24 souches de *M. abscessus* ni des 6 souches de *M. massiliense* ne présentaient de résistance à la clarithromycine.

3. *M. leprae*

Nous avons reçu 10 biopsies dont seulement 2 microscope+ (rechutes de Martinique et Comores et pour lesquelles les résultats de l'antibiogramme ne sont pas encore disponibles).

Ces 2 souches ont été considérées comme sensibles à la rifampicine et aux sulfones sur la base des tests génétiques car les gènes *rpoB* et *foIP* sont sauvages.

Détection de mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis*

Tests effectués sur des souches

Souches : 197 souches, la plupart ayant fait ultérieurement l'objet d'un antibiogramme, ont été soumises à la détection moléculaire rapide de la résistance à la rifampicine et l'isoniazide.

Ces souches ont été adressées au CNR pour recherche de résistance (a) parce qu'isolées chez des malades déjà traités pour tuberculose et/ou immunodéprimés et/ou provenant d'un pays de forte endémie de résistance ou (b) pour contrôle de résistance à la rifampicine ou à l'isoniazide.

Résultats

rifampicine (RIF) :

- pas de mutation dans la portion du gène *rpoB* ciblée : 81%
- mutation du gène *rpoB* S531L 14% (3/4 de souches mutées)
- mutations du gène *rpoB* en position 516 ou 526 5%

Toutes les mutations étaient corrélées avec la résistance à RIF évaluée par antibiogramme confirmant la robustesse des tests génétiques pour détecter la résistance à RIF.

Isoniazide (INH)

- pas de mutation ni dans *katG*, ni dans *inhA* ni dans la région régulatrice du gène *inhA* : 45%
- mutation en position 315 du gène *katG* (presque toujours mutation S315T) 34%, toujours corrélée avec la résistance à INH par antibiogramme phénotypique
- mutation dans la région régulatrice du gène *inhA* 16% (n= 29), presque toujours par substitution C->T en position -15 (n=27) et toujours corrélée avec la résistance à INH
- mutation dans le gène *katG* en dehors de la position 315 (3%): A110V (n=2), E340K (n=1), F183L (n=1), R484H (n=1), W191G (n=1) et toujours corrélée avec la résistance à INH
- mutation dans le gène *inhA* (2%) : D6V dans 1 souche sensible, I194T dans 2 souches résistantes

Au total, des mutations dans *katG* ou le promoteur de *inhA* connues pour être liées à la résistance à INH ont été trouvées dans 79 souches des 84 (94%) considérées comme résistantes à INH sur la base de l'antibiogramme. Ce pourcentage obtenu par combinaison de plusieurs tests génotypiques est supérieur de 16% à celui obtenu avec le test Genotype MTBDR utilisé seul, démontrant que la détection de la résistance à INH chez *M. tuberculosis* par test génétique nécessite l'ajout de tests complémentaires,



basés sur le séquençage complet des gènes *katG*, *inhA* et de son promoteur lorsque les résultats des tests commercialisés sont négatifs et que la résistance à INH est néanmoins fortement suspectée.

Multirésistance

L'utilisation du kit Genotype MTBDR® et des séquençages vus ci-dessus a permis de détecter ou de confirmer rapidement, bien avant les résultats de l'antibiogramme phénotypique, la multirésistance de la totalité des 38 souches MDR reçues en 2007.

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 138 souches, c.a.d. les 38 souches MDR et d'autres souches pour lesquelles l'interprétation du test phénotypique était impossible en raison des difficultés de croissance au pH acide indispensable à l'activité du PZA, en particulier des souches dysgoniques (c.a.d. de croissance difficile) :

– pas de mutation dans *pncA* pour 104 souches dont 61 ont été trouvées ultérieurement sensible au PZA par antibiogramme phénotypique, 13 pour lesquelles le résultat de l'antibiogramme était ininterprétable et 30 pour lesquelles l'antibiogramme n'avait pas été effectué (n.b. ces 30 souches étaient toutes sensibles à RIF et INH, souches chez lesquelles la résistance au PZA est rarissime).

- mutation dans *pncA* chez 29 souches dont 11 ont été trouvées ultérieurement résistantes au PZA par antibiogramme phénotypique, 10 ont été trouvées ultérieurement sensibles au PZA (insertion en position 130, A146V, C14G, codon stop en position 14, G75V, I31S, V125G n=3, V163G) ce qui a conduit à considérer le résultat phénotypique avec réserve, et 8 pour lesquelles les résultats de l'antibiogramme phénotypique étaient ininterprétables.

Les discordances entre les résultats du séquençage de *pncA* et ceux de l'antibiogramme phénotypique ont été mentionnées dans nos rapports précédents. A l'heure actuelle, le séquençage de *pncA* est fiable pour prédire la sensibilité au PZA en cas d'absence de mutation mais en revanche, lorsque le gène est muté, l'interprétation est beaucoup plus difficile et nécessite des tests biochimiques complémentaires. Ces discordances pourraient être liées selon les cas (a) au fait que les mutations sont localisées loin du site actif de PncA et donc sans impact sur l'activité de la pyrazinamidase ou (b) au fait que l'antibiogramme phénotypique tel qu'il est effectué aujourd'hui selon les recommandations (test avec une concentration unique de 200mg/l) ne permet pas de détecter des bas niveaux de résistance au PZA.

Fluoroquinolones (FQ)

Le séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour la gyrase, cible des fluoroquinolones, a été effectué pour 105 souches c.a.d pour les 38 souches multirésistantes et pour d'autres souches suspects (ex : rechutes) :

- mutation du gène *gyrA* chez 5 souches qui étaient toutes MDR, dont 3 connue pour entraîner la résistance aux FQ (A83V et G81C), ce qui a été confirmé ultérieurement par l'antibiogramme et 2 que nous avons montré (T73A, Aubry AAC 2006) ne pas être associée à la résistance aux FQ mais sont probablement un polymorphisme (Silent Nucleotidic Polymorphism ou SNP).

- pas de mutation pour les 100 autres souches dont la sensibilité aux FQ a été confirmée par l'antibiogramme phénotypique.

Des mutations dans *gyrB* trouvées dans 3 souches (G485A, N399D) sont sans impact sur la sensibilité aux FQ et correspondent vraisemblablement à des polymorphismes.

Tests effectués directement sur des prélèvements

27 prélèvements ont été soumis, à une détection moléculaire rapide de la résistance à RIF (PCR nichée puis séquençage de *rpoB* ou hybridation sur bandelette Genotype MTBDR®), dont 25 (19 cas microscope+ et 6 microscope-) ont permis l'amplification du gène : 6 avaient une mutation dans *rpoB* et 19 n'avaient pas de mutation. Pour 2 prélèvements l'amplification n'a pas pu être obtenue. Les 6 prélèvements pour lesquels une mutation *rpoB* a été détectée se sont révélés, après culture, positifs avec *M.tuberculosis* résistant à la rifampicine.

L'amplification du gène *pncA* pour détection de la résistance au PZA a été tentée sur 5 prélèvements (4 microscopique +) par PCR nichée dont 4 ont permis l'amplification du gène, sauvage dans tous les cas.

Les résultats des tests de détection moléculaire de la résistance appliqués directement à des prélèvements confirment bien que la performance de ces tests dépend de la richesse en bacilles des prélèvements. A l'heure actuelle, l'intérêt de ces tests est évident pour la résistance à RIF en cas de suspicion de multirésistance, même si l'amplification est parfois un échec (2/27 soit 8%) mais les résultats sont encore décevants pour le PZA en raison des difficultés d'amplification.



Expertise en santé animale

En 2007, nous avons reçu un seul prélèvement animal en provenance du Zoo de Vincennes. Il s'agissait d'une infection chez un crocodile du Nil chez qui nous avons isolé une souche de *M. marinum*.

Malgré la pérennité des relations entre le CNR-MyRMA et les vétérinaires du Zoo de Vincennes, du Jardin des plantes et de Maison-Alfort, nos collègues vétérinaires ont progressivement moins recours au CNR du fait de l'augmentation de l'expertise en mycobactériologie du laboratoire de l'AFSA, en particulier grâce à l'arrivée, il y a quelques années, de Mme Laura Boschioli.

Analyse de l'évolution des tendances en termes d'activité

Le nombre de souches reçues a augmenté en 2007 de 16% par rapport à 2006, première année de fonctionnement d'un seul CNR mycobactéries qui avait déjà entraîné une augmentation de l'activité d'expertise du CNR de 50%.



3. Activités de surveillance

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Les réseaux de partenaires

La surveillance de certaines infections et de la résistance aux anti-infectieux est basée sur 2 réseaux de partenaires, pilotés par le CNR : le réseau Azay-Mycobactéries des CHU 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 organisés en réseau (Groupe " Azay Mycobactéries ", animé par le Dr Jeannette Texier-Maugein - Bordeaux). Pour ses activités de surveillance de la résistance, le réseau est conjointement animé par le CNR-MyRMA.

La surveillance assurée à travers le 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, comme le recommande l'OMS : âge, pays de naissance, co-infection par le VIH, localisation de la tuberculose, antécédent de traitement antituberculeux.

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

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, avec l'aide de près de 310 laboratoires correspondants (Réseau CNR-MDR), la surveillance annuelle du nombre de malades ayant une tuberculose bactériologiquement confirmée 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).

Estimation de la couverture des réseaux ou représentativité, évolution

Réseau Azay-Mycobactéries

Evolution du réseau

Le nombre de CHU participant au réseau Azay-Mycobactéries a doublé depuis 1995 : 15 en 1995, 23 en 2001, 27 en 2002, 32 en 2003, 33 en 2004 et 32 en 2006. Deux CHU sont toujours dans l'impossibilité de fournir l'ensemble des données de surveillance en 2006 et leurs données ne sont pas incluses dans celles du réseau.

Le réseau Azay-Mycobactéries couvre 19 des 22 régions métropolitaines françaises. La région Alsace a rejoint le réseau en 2005 grâce à la participation du CHU de Strasbourg. La région PACA qui était couverte les années précédentes n'a pas été en mesure de fournir des résultats en 2006. Les autres régions qui restent non couvertes depuis le début de la surveillance sont l'Auvergne et la Corse. L'Auvergne intègrera le réseau de surveillance en 2008 pour les malades diagnostiqués en 2007. La Corse ne comporte pas de CHU et ne peut donc être directement représentée dans le réseau Azay-Mycobactéries des laboratoires de CHU.

Estimation de la qualité du réseau

Nous avons conduit en 2004-05 une première évaluation sur les données de la région Ile-de-France, en comparant les données recueillies par ce réseau à celles recueillies dans le cadre de la Déclaration Obligatoire, en collaboration avec l'Institut de Veille Sanitaire (Didier Che), la DASS de Paris (Jean-Michel Thiolet et Sabine Henry), la DDASS du Val-de-Marne (Cyril Rousseau), le Conseil Général du Val-de-Marne (Christine Poirier) et la DDASS des Hauts de Seine (Juan-Manuel Vinas). Les résultats de cette 1^{ère} évaluation publiés en 2006 (Guerrin-Tran et al. Eur J Epidemiol 2006 ; 21 :783-5 et Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 2006 (13):90-93) avaient montrés :

- que la sensibilité (exhaustivité des cas) est très bonne, d'au moins 96%
- que, pour les cas connus à la fois du réseau et de la DO, la concordance des données recueillies est très satisfaisante, à l'exception des données sur la localisation de la tuberculose qui ne jouent pas de rôle déterminant en terme de statistiques de résistance



- qu'il y a quelques différences entre les caractéristiques générales des populations surveillées par le réseau et la DO, essentiellement liées au fait que, par définition, les cas du réseau sont à culture positive alors que ceux de la DO regroupent toutes les formes de tuberculose dont une grande partie à culture négative.

Un nouveau travail a été entrepris en 2006 et achevé en 2007 pour évaluer le réseau AZAY-Mycobactéries, cette fois sur l'ensemble du territoire. Pour cela, nous avons utilisé la méthode d'échantillonnage par grappe proportionnée à la population telle que recommandée par l'OMS :

- tirage au sort de 10% des 1728 dossiers de l'année 2004 (175 dossiers)

- ajout, à ces 175 dossiers répartis en 32 grappes, de 2 dossiers dans chaque grappe pour remplacer d'éventuels dossiers introuvables et ainsi assurer l'inclusion finale d'au moins 175 dossiers, ce qui fait un total de 250 dossiers

- collection des données dans les dossiers médicaux et administratifs des malades : âge, sexe, nationalité, antécédent de traitement, statut de l'infection VIH

- analyse des données en les comparant à celles recueillies par les microbiologistes du réseau AZAY-Mycobactéries (analyse de concordance : test de kappa).

210 dossiers ont été analysés, soit 20% de plus que l'objectif.

Le tirage au sort des dossiers a fait que 21 des 32 CHU ont été impliqués dans l'étude.

Les résultats montrent une bonne concordance ($k > 80\%$ pour toutes les variables) entre les informations colligées par le réseau et celles obtenues par l'analyse des dossiers.

Le coefficient Kappa le plus bas est celui calculé pour la variable « antécédent de traitement » (0.52, IC95: 0.37-0.66) ce qui correspond à une concordance modérée. Cette variable est importante pour l'analyse des résultats la résistance puisqu'elle permet la stratification entre résistance « primaire » ou « secondaire ». Cependant, la plupart des discordances observées (11/29) sont des discordances considérées comme mineures (antécédents inconnus dans une des deux bases de données et connus dans l'autre).

Pour évaluer l'impact des discordances sur les taux de résistance observés par le réseau, ces taux ont été « corrigés » en prenant en compte les résultats des discordances des deux variables les plus importantes pour la résistance aux antituberculeux (c'est-à-dire antécédent de traitement et l'origine de naissance) en utilisant les données de contrôle recueillies dans les dossiers médicaux comme données de référence. Après correction des taux de résistance pour les erreurs de classification observées, tous les taux de résistance corrigés restaient en fait dans les intervalles de confiance à 95% des taux observés.

Ceci montre que la fiabilité des données produites par le réseau est correcte puisque les erreurs observées n'ont pas un impact important sur les taux de résistance.

A l'avenir, il faudra néanmoins insister à nouveau auprès des microbiologistes et cliniciens sur l'importance majeure de l'antécédent de traitement du patient dans la surveillance et la prise en charge de la tuberculose.

Ces résultats ont été publiés en 2008 (Khuê PM. *Epidemiol Infect.* 2008 ; 136 : 1172-78).

Analyse des caractéristiques du réseau CNR-MyRMA

La distribution des 292 laboratoires du réseau CNR-MDR ayant répondu en 2005 selon le nombre de cas microbiologiquement documenté a fait l'objet d'une analyse détaillée.

Les résultats montrent que la distribution est très hétérogène : extrêmes = 0-309 cas, 1^{er} décile : 43 cas, 1^{er} quartile : 18 cas, médiane : 7 cas, 3^{ème} quartile : 2 cas, 9^{ème} décile : 0 cas.

La moitié des cas de tuberculose diagnostiqués en 2005 sont concentrés dans les 25 laboratoires dont l'activité est la plus importante :

- 17 laboratoires de CHU dont 11 de l'APHP (7 de Paris intra-muros, 4 de la petite couronne) et 6 de province

- 4 hôpitaux généraux d'Ile-de-France et 1 de Cayenne

- 3 gros laboratoires privés

Les 25 laboratoires ci-dessus ont identifié plus des 2/3 des cas MDR de l'année, alors qu'une cinquantaine de laboratoires ont identifié de 20 à 50 cas de tuberculose en 2005, dont un quart des cas MDR de l'année, qu'une soixantaine de laboratoires ont identifié de 10 à 19 cas de tuberculose en 2005, dont seulement 4 cas MDR et qu'enfin les 160 autres laboratoires ont identifié moins de 10 cas de tuberculose en 2005 dont 3 cas MDR.



Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Surveillance de la méningite tuberculeuse

Le CNR-MyRMA a réalisé tous les 5 ans depuis 1990 (1990, 1995 et 2000) une enquête sur la méningite tuberculeuse à culture positive. Un travail spécifique sur les performances de cette surveillance a été réalisé à partir des cas colligés en 2000, en collaboration avec l'InVS (enquête capture-recapture). Ce travail publié en 2005 (Cailhol *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:803-808) a démontré la nécessité de croiser les données des deux sources disponibles (DO et CNR-MyRMA) afin de corriger l'incidence mesurée par chacune de ces deux sources.

Suite à ces travaux, et en raison du faible nombre de cas de méningites tuberculeuses chez les enfants de moins de 5 ans, il a été décidé d'identifier chaque année ce nombre de cas qui est un des indicateurs proposés par l'International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) pour juger de la possibilité d'arrêt de la vaccination par le BCG.

Pour cela une enquête rétrospective concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants de < 5 ans de 2001 à 2005 a été entreprise en 2006 par CNR-MyRMA au travers le réseau des 310 laboratoires (cf chapitre 7). Les données sont croisées avec celles disponibles à l'InVS et recueillies dans le cadre de la Déclaration Obligatoire.

Le recueil d'information auprès des cliniciens et des laboratoires est encore en cours. Cette enquête a permis à ce jour d'identifier 9 cas de méningite à culture positive chez les enfants de moins de 5 ans durant la période 2001-2005, soit une moyenne de 2 cas par an.

Surveillance des infections à mycobactéries atypiques

Les mycobactérioses ou infections à mycobactéries atypiques qui sont des mycobactéries de l'environnement ne sont pas des infections contagieuses et ne font pas l'objet d'un recensement systématique. Les expériences des laboratoires de bactériologie des CHU concluent que ces infections sont rares, l'ordre de grandeur étant de 50 à 100 cas par an en France (en dehors du SIDA) pour les principales espèces *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. abscessus* et *M. fortuitum*. Cependant, en raison de (a) l'augmentation du nombre de malades aux défenses immunitaires amoindries (malades séropositifs pour le VIH, malades sous traitement immunosuppresseur..) et (b) de l'augmentation du nombre des actes invasifs (chirurgie esthétique, mésothérapie...), on peut craindre que le nombre de ces infections augmente et en particulier on peut craindre l'apparition de cas nosocomiaux, voire d'épidémies.

De plus, les expériences étrangères montrent que l'arrêt de la vaccination BCG systématique, devrait entraîner une augmentation des infections à mycobactéries atypiques, en particulier à *M. avium* complex.

La surveillance des infections à mycobactéries atypiques se fait (a) avec le Groupe Azay-Mycobactéries, avec lequel le CNR-MyRMA travaille en étroite collaboration depuis de nombreuses années (cf rapport CNR 2006) et (b) à travers les souches que le CNR reçoit.

La surveillance à travers le groupe Azay-Mycobactéries fait l'objet d'une analyse détaillée tous les 2 ans environ en raison du petit nombre de cas annuels d'infections à mycobactéries atypiques. Ce groupe n'a pas noté d'augmentation des cas en 2007. Il n'y a pas eu non plus en 2007 d'augmentation du nombre de souches d'espèces de mycobactéries atypique particulières.

Collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement.

Voir les sections 2.1 (santé animale) et 2.2 (environnement).

3.2. Surveillance de la résistance aux anti-infectieux

La surveillance menée par le CNR a porté en 2007, comme les années précédentes :

- sur la résistance aux antituberculeux de 1^{ère} ligne du complexe *M. tuberculosis* dans les nouveaux cas de tuberculose (résistance primaire) et les cas déjà traités (résistance secondaire)
- sur les cas de tuberculose à bacilles résistants à l'isoniazide et à la rifampicine (multirésistants ou MDR).

1. Définition de l'échantillon de souches testées

Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M. tuberculosis* aux antibiotiques : réseau du Groupe Azay-Mycobactéries



Les données recueillies en 2007 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2006 par 32 des 34 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries. Au total, le réseau a inclus 1509 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2006, soit environ le tiers des cas à culture positive diagnostiqués en France. Un antibiogramme a été réalisé pour 1507 de ces 1509 cas. Le nombre de cas inclus en 2006 est identique à celui des cas inclus en 2005 et inférieur de 10% à celui des cas inclus en 2003 et 2004 en raison de la non-participation de 2 CHU (cf ci dessus) et de la diminution de l'incidence de la tuberculose. L'Île de France représente un peu plus de 46% des 1509 cas recensés par le réseau. Deux régions ont recensé chacune environ 8-9% des cas : Rhône-Alpes (8,9%), Aquitaine (9,6%). Sept régions ont recensé chacune de 2 à 5% des cas. Dans les 9 dernières régions, le nombre de cas recensés représente moins de 2% du nombre total de cas du réseau.

Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants : le réseau CNR-MyRMA

Au cours de l'année 2007, le CNR-MyRMA a entrepris le recueil des données concernant l'année 2006. Comme chaque année, les données sont encore incomplètes au moment de rédiger le rapport d'activité : 202 laboratoires ont déjà répondu au questionnaire mais 92 (en majorité des laboratoires à faible activité) sont en train de finir de colliger leurs données.

2. Définitions utilisées pour exprimer la résistance

La surveillance a porté sur la résistance aux antituberculeux de 1^{ère} ligne (streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol) du complexe *M. tuberculosis* isolées de nouveaux cas de tuberculose (résistance primaire) et de cas déjà traités (résistance secondaire) et sur les cas de tuberculose à bacilles résistants à l'isoniazide et à la rifampicine (multirésistants ou MDR).

3. Résultats globaux et en fonction des critères pertinents

1. Surveillance de la résistance primaire et secondaire dans la tuberculose

Taux global de résistance « primaire »

Chez l'ensemble des 1254 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 2006 de **8,9%**.

Le taux de résistance primaire à chacun des antituberculeux était beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (**INH 5,9%**) et la streptomycine (SM, 5,2%) que pour la rifampicine (**RMP 1,4%**) et l'éthambutol (EMB, 0,6%). La totalité des 17 souches résistantes à RMP étaient aussi résistantes à INH. La proportion de cas **multirésistants « primaires »** était donc de **1,4%**. Ces chiffres sont peu différents de ceux de l'année 2005.

Résistance primaire et pays de naissance

Le taux de résistance primaire à au moins un antituberculeux chez les 497 malades nés en France était de 5,8% alors qu'il était le double, de 11,2% chez les 724 nés à l'étranger ($p < 0,01$). Le taux de résistance était statistiquement plus élevé chez les malades nés à l'étranger pour chaque antituberculeux.

Cette différence était significative pour INH (8,0% vs 3,2% ; $p < 0,01$), RMP (2,2% vs 0,2% ; $p < 0,01$) ET SM (6,3% vs 3,6% ; $p < 0,04$).

La quasi totalité des souches (16 sur 17) multirésistantes « primaires » étaient isolées chez des malades nés à l'étranger.

Monorésistance primaire à la rifampicine

Aucune souche résistante à RMP mais sensible à INH (dite "monorésistante") n'a été isolée en 2006 chez les nouveaux cas de tuberculose.

Taux global de résistance « secondaire »

Chez les 111 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 18,0%, soit le double de celui vu plus haut pour les nouveaux cas. Ce taux est un peu inférieur à celui observé en 2005 (21,4%). Le taux de résistance "secondaire" à INH (14,4%) est légèrement supérieur à celui observé pour SM (11,7%). Le taux de résistance secondaire à RMP (13,6%) était près de 10 fois plus élevé que le taux de résistance primaire à cet antibiotique (1,4%).

La quasi totalité des souches résistantes à la rifampicine (13/14) étaient multirésistantes. La proportion de cas **multirésistants « secondaires »** était de **11,7%**, soit 8 fois plus élevée que la proportion des cas multirésistants « primaires ».

Résistance secondaire et pays de naissance

Le taux de résistance "secondaire" à au moins un antituberculeux était de 13,0% chez les 46 malades nés en France alors qu'il était près du double de 21,9% chez les 64 malades nés à l'étranger ($p = 0,32$). Le taux de résistance était plus élevé chez les malades nés à l'étranger pour chaque antituberculeux, mais



les différences étaient statistiquement significatives pour SM (17,2% vs 4,3%, $p=0,02$). Trois quarts des souches multirésistantes (10 sur 13) étaient isolées chez des malades nés à l'étranger.

Monorésistance secondaire à la rifampicine

Une seule souche "mono-résistante" secondaire à RMP a été isolée chez les malades déjà traités. Comme les cas identifiés en 2004 et 2005, le malade était né en France et il était co-infecté par le VIH.

2. Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants

Les données disponibles à ce jour concernent 4291 cas de tuberculose bactériologiquement prouvée, soit 68% des effectifs totaux des années 2004 et 2005. Il reste donc environ 700 cas à colliger (N.B. pour l'année 2005, les 91 laboratoires qui n'avaient pas encore répondu en avril 2006 avaient colligé 750 malades tuberculeux).

Le nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants signalés par les 202 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour est de 55, soit 1,3% des 4291 cas. Fait rassurant, ce pourcentage est identique à ceux des dernières années (1,3 à 1,4%) (tableau 7.5).

En croisant la liste des 55 cas MDR de 2006 recensés à ce jour par l'enquête du CNR-MyRMA à la liste des cas MDR de 2006 connus du CNR-MyRMA à travers ses activités d'appui aux laboratoires de bactériologie et aux services cliniques pour les cas de tuberculose MDR (chapitre 4), le total des cas MDR pour 2006 est actuellement de 60, soit inférieur à celui enregistré en 2003 ($n=77$) et 2004 ($n=68$) et 2005 ($n=65$).

Parmi les 60 cas MDR colligés en 2006 (55 connus à travers le réseau MDR, 5 à travers l'envoi de souches), 6 (10%) étaient déjà connus les années précédentes. Cette proportion de cas chronique est proche de celles observée au cours des 4 dernières années (9 à 16%).

Les caractéristiques des 54 cas de tuberculose MDR colligés pour la première fois en 2006 sont les suivantes :

- 61% sont des hommes
- 8 (13%) sont nés en France métropolitaine, 2 (3%) dans les DOM et 44 (74%) à l'étranger, dont 23 en Afrique sub-saharienne, 6 au Maghreb, 10 en Europe de l'Est, 2 en Asie, 1 en Amérique du Sud, 2 en Afrique sans précision
- l'âge médian est 34,5 ans (17% de 10 à 24 ans et 33% de 25 à 34 ans),
- 11% sont séropositifs pour le VIH, 80% sont séronégatifs (statut VIH inconnu 9%)
- 90% des cas ont une tuberculose pulmonaire
- 63% ont un examen microscopique positif (c.a.d. sont très contagieux)
- 67% n'ont jamais été traités (MDR « primaire »)
- le diagnostic bactériologique a été fait pour 56% des cas en Ile de France
- 50% des cas ont été suivis en Ile de France.

Les constatations faites depuis 2002 pour les cas de tuberculose multirésistante vus en France (malades plus jeunes, plus souvent nés à l'étranger et pour une proportion importante sans antécédent de traitement, ou multirésistance « primaire ») valent pour les cas de 2006.

Analyse des tendances

L'analyse de l'évolution temporelle des caractéristiques des malades sur les 12 années de la surveillance (1995-2006) montre que :

- la proportion de malades nés à l'étranger continue d'augmenter, de 38,1% à 56,4% ($p<0,01$; χ^2 de tendance).
- la proportion de malades avec des antécédents de traitement continue de diminuer, de 10,8% à 7,3% ($p<0,01$; χ^2 de tendance) ce qui suggère que la qualité de la prise en charge de la tuberculose en France ne se dégrade pas.
- la proportion de malades co-infectés par le VIH reste stable autour de 10%.

Le taux global (c.a.d. à au moins un antituberculeux de première ligne INH, RMP, EMB, SM) de résistance "primaire" a oscillé de 1995 à 2006 entre 8 et 10% (moyenne 9%). Le taux global de résistance "secondaire" a, lui, oscillé autour de 20%.

L'analyse de l'évolution de la résistance à chacun des antibiotiques pris séparément montre :

Chez les nouveaux cas, une augmentation faible mais significative de la résistance à l'isoniazide de 3,7 % en 1995 à 5,9 % en 2006 ($p<0,01$; χ^2 de tendance). Cette tendance à l'augmentation persiste si on ne considère que les 19 laboratoires ayant participé à la surveillance depuis 1995-1996. Il y a une légère tendance à l'augmentation de la résistance à la rifampicine à la limite de la significativité (0,7-1% à 1,4%).

Chez les cas déjà traités, étant donné le faible nombre de cas chaque année, les tendances évolutives sont difficiles à interpréter et il n'y a pas de variation statistiquement significative au cours des 12 années de surveillance : fluctuation entre 8 et 18% pour l'isoniazide et entre 5 et 14% pour la rifampicine. Le taux



de résistance secondaire à la rifampicine et le taux de multirésistance secondaire sont au dessus de 10%, alors qu'ils étaient inférieur à 10% les deux années précédentes (2004-2005).

Les données concernant l'évolution de la résistance primaire et secondaire durant les 10 années 1995-2004 ont été publiée en 2007 (Khuê et al. Eur Respir J 2007 ;30 :937-944).

Il n'y a pas eu d'aggravation du phénomène de multirésistance en 2006. Il pourrait même y avoir une tendance à la diminution de la multirésistance qui pourrait être confirmée en 2007 d'après le nombre de souches MDR reçues en 2007 au CNR-MyRMA et provenant de patients diagnostiqués en 2007 (n=38 cf ci-dessus).

3.3. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

En 2007, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser le **génotypage** moléculaire (empreintes digitales génomiques) de **221** souches de *M.tuberculosis*.

Contexte épidémiologique

Les contextes épidémiologiques des demandes de génotypage peuvent être regroupés de la manière suivante :

- suspicion de tuberculose nosocomiale ou de transmission dans des collectivités, pour lesquelles le génotypage complétait l'enquête épidémiologique « autour d'un cas » réalisée par la DDASS ou le Service de lutte anti-tuberculeuse (SLAT)
- étude systématique des souches des cas de tuberculose à bacilles multirésistants (souches MDR) dans le cadre du programme Euro-TB
- surveillance systématique de la transmission dans les foyers parisiens de SDF et de migrants dans le cadre du programme mis en place avec la DASES (Dr F. Antoun) en 1996
- étude systématique « Identification des facteurs de risque cliniques, bactériologiques et génétiques contrôlant l'infection par *M.tuberculosis* dans des familles exposées à un cas de tuberculose contagieuse » mis en place avec le SLAT du Val de Marne (PHRC 2004-2007)
- suspicion de contamination de laboratoire.

Stratégie et organisation

Réception de toutes les demandes par le laboratoire coordinateur, transmission des souches au laboratoire associé pour MIRU-VNTR => résultat provisoire rapide, puis analyse par méthode RFLP au laboratoire coordinateur des souches non distinguables => résultat définitif.

La méthode RFLP est appliquée de manière systématique à toutes les souches MDR (surveillance Euro-TB)

Résultats

Complément d'enquêtes épidémiologiques « autour d'un cas » (87 souches)

19 suspicions de transmission en collectivité (50 souches) : le typage a permis de confirmer la transmission : 2 fois dans des lycées (4 cas secondaires dans un cas et 2 dans l'autre), 1 fois au sein d'une université (1 cas secondaire), 2 fois dans un foyer d'hébergement pour personnes précaires (1 cas secondaire à chaque fois), 1 fois dans le cadre d'activités sportives (2 cas secondaires), 2 fois au sein d'entreprises (1 cas secondaire à chaque fois) et 1 fois dans la communauté à travers un réseau d'amis (1 cas secondaire)

3 suspicions de transmission nosocomiale (9 souches) : le typage a permis de confirmer la transmission : 1 fois entre un malade et un membre du personnel hospitalier (1 cas secondaire)

1 suspicion de rechute (2 souches), confirmé par le typage (malade non observant).

Etude de la transmission dans les familles du Val de Marne (30 souches)

Dans le cadre de l'étude sur les cas de tuberculoses des habitants du Val de Marne (94), 30 souches ont été génotypées par méthode RFLP. Les résultats seront présentés ultérieurement lors de la clôture de l'étude.

Programme MDR Euro-TB (38 souches)



Les 38 souches MDR reçues en 2007 a été effectué par la technique de référence RFLP ce qui a permis de mettre en évidence 6 groupes de souches de profils identiques ou similaires :

Groupe 1 (4 souches) : malade né Portugal, vivant entre la France et le Portugal (cas index)

2 malades de la fratrie du cas index et nés en France, 1 voisin d'immeuble du cas d'index

Groupe 2 : transmission familiale entre une mère (originaire du Cameroun) et son fils nouveau-né

Groupe 3 : 1 malade originaire de Guinée nièce d'une des deux malades aussi originaires de Guinée identifiés en 2006 (cf rapport 2006) et de 2006

Groupe 4 : 3 malades originaires du Congo (2 république démocratique du Congo et 1 Congo sans précision) dont les souches ont des profils similaires en RFLP mais non identiques. Ces 3 souches ont un profil différent des 4 souches isolées en 2006 chez 4 malades également originaires de RDC et qui appartenaient à un même clone.

Groupe 5 : 1 malade originaire de RDC dont la souche est reliée à un clone de 4 souches de malades originaires de RDC décrit en 2006 mais dont le profil de sensibilité aux antibiotiques est différent (il ne semble pas avoir eu de contact entre ces patients).

Groupe 6 : 1 malade originaire d'Ukraine dont la souche avait le même profil que celle isolée chez une malade de 2006 originaire de Congo Brazaville. Les deux souches avaient des mutations différentes dans le gène *rpoB* et les deux malades étaient pris en charge dans des villes très éloignées en France. Il ne semble donc pas y avoir eu de lien entre ces deux patientes en France. En revanche après enquête, nous avons appris que la malade originaire du Congo avait fait des études en Russie. Il s'agit donc vraisemblablement d'un groupe de souches Russe et non pas d'une contamination au Congo.

Au total, en 2007, nous avons donc mis en évidence **3 évènements de transmission croisée directe de souches MDR survenus en France** : 1 de 3 cas secondaires (2 intra-fratrie, 1 dans l'immeuble), 1 de 1 cas (intrafamilial mère-enfant et 1 de 1 cas (intrafamilial tante-nièce).

Pour les autres groupes de souches bactériologiquement proches, les différences phénotypiques (sensibilité aux antibiotiques) et/ou génotypiques (mutations dans les gènes *rpoB*, *pncA* et *gyrA*) et les informations dont on dispose concernant l'histoire des malades, ne sont pas en faveur de relation directe entre les malades en France.

Etude systématique « Val-de-Marne »

Les résultats seront dépouillés en 2008-2009

Suspicion de contamination de laboratoire (28 souches)

Les 28 souches ont été adressées par 9 laboratoires de microbiologie pour 12 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. Dans 8 des 12 épisodes, le typage a confirmé la contamination de laboratoire (souches non distinguables). Ces 8 épisodes totalisaient 18 souches, par groupes de 2 souches (6 groupes) ou de 3 souches (2 groupes).

Surveillance de la transmission de tuberculose dans les foyers parisiens (20 souches)

Contexte

En collaboration avec le Dr Fadi Antoun, pneumologue responsable de la tuberculose à la Direction de l'Action Sanitaire et de l'Enfance de la ville de Paris (DASES), une étude systématique des cas de tuberculose chez les malades fréquentant les foyers d'accueil parisiens pour personnes sans domicile fixe (SDF) et pour travailleurs migrants est effectuée depuis 1996. Les tuberculeux de ces foyers sont hospitalisés à la Pitié-Salpêtrière. Dans les rares cas où ils sont hospitalisés ailleurs, les souches sont envoyées au CNR-MyRMA. Les empreintes génomiques des souches de bacilles tuberculeux isolées chez ces malades sont systématiquement comparées par analyse RFLP.

Les résultats pour les années 1998 à 2006 ont été présentés dans les précédents rapports d'activité.

Cas

- 13 cas chez des SDF (7 ayant déclaré fréquenter des foyers et 6 ne pas en fréquenter)

- 7 cas de tuberculose chez les travailleurs migrants vivant en foyer.

Résultats

- 6 souches des SDF avaient des profils RFLP similaires à au moins une autre souche de la banque de données (souches reliées "bactériologiquement") : 4 chez des malades déclarant fréquenter un des foyers inclus dans la surveillance et 2 chez des malades déclarant ne pas en fréquenter.

- 4 des souches isolées chez les travailleurs migrants étaient reliées bactériologiquement à une autre souche de la banque de données.

Evolution de la situation 1996-2007

Tuberculose chez les SDF



Le nombre total de cas de tuberculeux de ces foyers se maintient autour de 15 par an. Après plusieurs années de baisse dans le nombre de cas liés bactériologiquement nous constatons une réaugmentation en 2007 qui nous ramène au niveau des années 2000 sans toutefois atteindre celui du milieu des années 90 (80% de cas liés).

Comme les années précédentes, les souches des SDF déclarant ne pas vivre en foyer sont globalement moins souvent liées bactériologiquement que celles des SDF vivant en foyer : 2 sur 6 (33%) contre 4 sur 7 (57%), suggérant que, même si la transmission croisée de la tuberculose va bon train chez les SDF hors foyer, probablement en raison de la promiscuité des lieux de vie de ces SDF, la transmission croisée est plus intense dans les foyers.

Tuberculose dans les foyers de migrants

Le nombre de cas de tuberculose bactériologiquement confirmée diagnostiqués chez des malades vivants en foyers de migrants, stable entre 1994 et 2001 (10-20 cas/an) avait brusquement augmenté au cours de l'année 2002 (57 cas) en rapport avec l'épidémie qui s'est développée au foyer C. Tillier (75012). En 2003, le nombre de cas (n=27) était beaucoup moins important qu'en 2002 (n=57) mais toutefois encore supérieur à celui des années 1994-2001 (n=10 à 20/an). Parmi les cas de 2003, environ la moitié (n=14) provenaient du foyer Tillier et étaient reliées bactériologiquement. En 2004, le nombre de cas (n=13) était revenu au niveau antérieur, 7 provenant encore du foyer Tillier. En 2005, le nombre avait encore diminué (n=7), 4 provenant encore du foyer Tillier. En 2006, il n'y avait plus que 4 cas, dont 1 seul provenait du foyer Tillier. En 2007 on a dénombré 7 cas dont 1 en provenance du foyer Tillier.

Parmi les 4 souches du foyer Terres au Curé, 2 étaient reliées entre elle, une était non reliée et 1 était reliée à une souche d'un patient de 2006 ne résidant pas en foyer.

3.4. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Programme MDR Euro-TB

Conformément aux engagements pris dans le cadre du programme MDR Euro TB, le génotypage des 38 souches MDR reçues en 2007 a été effectué par la technique de référence RFLP (cf ci-dessus). Les profils RFLP sont adressés au centre coordinateur (KNCV) pour analyse comparative avec les souches MDR provenant des autres pays d'Europe.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Le CNR a participé aux enquêtes suivantes :

- Epidémie d'infections cutanées à mycobactéries atypiques après mésothérapie (cf section 4)
- Cas de tuberculose à *M. bovis* en Seine-Maritime (cf section 5)
- Cas groupés de tuberculose MDR dans 2 famille de Romainville (cf section 3.3 et 5)

Par ailleurs le CNR a organisé le contrôle de qualité externe des antibiogrammes de *M. tuberculosis* des laboratoires du réseau AZAY-mycobactéries qui fournit des les données permettant la surveillance de la résistance aux antituberculeux en France.

4. Alerte

Epidémie d'infections cutanées à mycobactéries atypiques après mésothérapie

Le CNR-MyRMA a été impliqué dans l'investigation d'une épidémie de 16 cas d'infection cutanée à mycobactéries atypiques causée par des actes de mésothérapie, conjointement avec le CCLIN Paris-Nord, la DDASS de Paris et le CIRE Ile de France, épidémie ayant fait l'objet d'un signalement externe d'infections nosocomiales le 29 janvier 2007. L'enquête a porté sur 111 patients incluant les 16 cas



d'infection et 95 patients exposés. Ces patients avaient tous reçu un traitement par mésothérapie dans un même cabinet d'un médecin généraliste de novembre 2006 à janvier 2007.

Nous avons montré que 12 des 16 cas étaient infectés à *M. chelonae*, 1 à *M. frederiksbergense* et 1 à ces 2 espèces. C'est la première fois que *M. frederiksbergense* (espèce de mycobactérie à croissance rapide décrite récemment) est impliquée dans des cas d'infection chez l'homme. L'identification des espèces mycobactériennes a été faite par méthode génotypique avec la trousse Mycobacterium®, Hain Lifesciences et par séquençage du gène *rrs* pour *M. frederiksbergense* et du gène *hsp* pour *M. chelonae*. Les souches de *M. chelonae* isolées chez les patients avaient toutes la même empreinte digitale génomique par électrophorèse en champ pulsé que nous avons mise au point pour l'occasion, ce qui était en faveur d'une source commune.

L'évaluation des pratiques avait suggéré que la source de mycobactéries pouvait être l'eau du robinet du cabinet, utilisée pour nettoyer et rincer le pistolet-injecteur utilisé pour les injections faites à chacun des cas. La recherche de mycobactéries dans le cabinet (surfaces, eau du lavabo) a montré la présence dans l'eau froide du lavabo d'une souche de *M.chelonae* de même empreinte digitale génomique que les souches des cas.

Du fait de la multirésistance des souches de *M. chelonae* et de la gravité de l'infection chez certains patients, nous avons étudié l'activité bactéricide des antibiotiques dont l'activité in vitro était la meilleure, à savoir la clarithromycine, la tigécycline, la tobramycine et la ciprofloxacine. La bactéricidie était globalement médiocre que ce soit pour les antibiotiques pris isolément, ou en les associant par deux, par trois ou par quatre : au mieux les antibiotiques tuaient 99% de bactéries.

La prise en charge thérapeutique et le suivi des malades ont été assurées par les praticiens concernés (E. Caumes, Maladies Infectieuses, et JP Méningaud, Chirurgie plastique) en collaboration étroite avec le CNR, avec le souci de standardiser le plus possible le diagnostic, le traitement antibiotique et le traitement chirurgical.

C'est la première fois qu'est observé en France un si grand nombre de cas d'infections sous-cutanées à mycobactéries atypiques en médecine générale, ce qui a eu 3 conséquences :

(1) l'organisation par le Ministère de la Santé de réunions de synthèse en présence des professionnels spécialisés en mésothérapie, à laquelle participait aussi l'Afssaps et où le CNR a présenté le dossier microbiologique, (2) d'encourager le CNR d'entreprendre une étude systématique sur la présence des mycobactéries dans l'eau (cf section 2.1) et (3) de justifier le renforcement de la vigilance autour des mesures d'hygiène au cours des pratiques médicales invasives et de mettre l'accent sur les procédures médicales à risque qui pourraient recourir à l'usage de l'eau du réseau de distribution.

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

Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

Enseignements

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

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

DIU Dermatologie infectieuse et tropicale, Université Paris 6,

DIU Antibiotologie, Université Nice Sophia-Antipolis

DIU Chimiothérapie des infections nosocomiales, Université Paris 11 et 12

DIU Stratégie thérapeutique en Pathologie Infectieuse, Université Paris 5 et 7

Formations

Stagiaires 2007 :



- un stagiaire vietnamien (Pham Khue), qui a préparé et soutenu sa thèse de science au CNR de 2005 à 2007 (soutenance en janvier 2008), pour participer à l'évaluation du réseau Azay-Mycobactéries, comparativement à celle du réseau de la région de Haiphong.
- le Dr Raymond Kouassi N'Guessan pour une période de 6 mois, pour (1) une formation intensive aux techniques de Biologie Moléculaire, et (2) l'application de ces méthodes pour la caractérisation de 200 souches de *M.tuberculosis* isolées à Abidjan (Côte d'Ivoire).

Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :

Les données de surveillance de la résistance aux antituberculeux sont diffusées dans des publications internationales ainsi que dans le bulletin épidémiologique hebdomadaire.

Rétro-information aux partenaires

Diffusion aux professionnels : conférences, Site web

Le site internet <http://cnrmyctb.free.fr> a été créé en 2006 et est actuellement hébergé gratuitement par le FAI « FREE ».

La technologie utilise le logiciel libre SPIP (licence GNU) dédié à l'administration de sites internet. Ce logiciel présente les avantages suivants : (a) il permet un accès sécurisé pour les administrateurs, (b) il ne nécessite pas d'apprentissage spécifique de la gestion de site ou du langage HTML et enfin (c) il permet d'afficher simplement en page d'accueil des informations brèves, ce qui facilite la visibilité des nouvelles informations mises sur le site.

Le site est régulièrement mis à jour avec :

- la nouvelle fiche d'information à fournir au CNR en cas de demande d'analyse
- la fiche annuelle de l'enquête tuberculose multirésistante et la mise en place d'un questionnaire qui peut être rempli directement en ligne sur le site
- les résultats annuels de la surveillance de la tuberculose multirésistante et de la résistance primaire et secondaire
- les nouvelles publications du CNR

Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)

Le CNR dispose d'une adresse électronique (cnrmyctb@free.fr) qui est renvoyée vers l'adresse professionnelle d'un des membres du CNR et ainsi consultée quotidiennement.

Les appels téléphoniques émanent soit de laboratoires correspondants soit de cliniciens prenant en charge des patients ayant des infections mycobactériennes. Ils représentent environ 5 à 10 appels par jour.

Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

Cas groupés de tuberculose MDR dans 2 familles de Romainville (DGS) : le CNR a réalisé l'antibiogramme et le génotypage des souches et a participé aux décisions de traitement des cas et des cas contact.

Tuberculose XDR dans vol Atlanta-Paris (DGS, CDC, ECDC) : le CNR a participé à la mise au point de la stratégie de dépistage et de prise en charge des cas contacts.

Prise en charge des abcès post-BCG (AFSSAPS) : le CNR a participé à la mise au point de recommandations pour la prise en charge des abcès secondaires à une vaccination par le BCG.

Epidémie d'abcès à *M. chelonae* suite à des actes de mésothérapie (DGS, CCLIN) : cf section 4.



Cas de tuberculose à *M. bovis* en Seine-Maritime (InVS) : le CNR a communiqué le nombre de souches de *M. bovis* reçues depuis l'an 2000. Cette demande faisait suite à l'étude de l'impact humain d'une épidémie animale de cas d'infection à *M. bovis*.

6. Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

Recherches sur les mécanismes de résistance des mycobactéries aux antibiotiques

Résistance au pyrazinamide (PZA) chez *M. tuberculosis*

Objectif : mise au point d'un test génotypique permettant de prédire la sensibilité au PZA.

Dans le but d'établir les relations entre la structure de la pyrazinamidase, son activité enzymatique et la résistance au pyrazinamide, nous avons entrepris de déterminer la structure cristallographique de PncA de *M. tuberculosis*. Pour cela, le gène *pncA* de *M. tuberculosis* a été amplifié et cloné dans un vecteur d'expression pET-29. Le vecteur recombinant a été introduit dans une souche de *E. coli* BL21 (DE3) utilisée comme réceptrice pour induire l'expression de la protéine PncA.

Résultats : après expression, la protéine a été extraite, purifiée par chromatographie liquide et concentrée à 20 mg/ml. Des cristaux utilisables pour la diffraction des rayons X ont été obtenus. Les résultats de la collecte des clichés de diffraction sont en cours d'interprétation. Ils permettront d'établir la structure 3D de PncA de *M. tuberculosis*.

L'obtention de la structure de la protéine PncA de *M. tuberculosis* sera une avancée majeure pour interpréter des tests génotypiques destinés à prédire la résistance au pyrazinamide.

Etudes des mécanismes de résistance au R207910 chez *M. tuberculosis*

Objectif : anticiper les phénomènes de résistance acquise, qui constituent un obstacle à l'efficacité de tous les antimycobactériens connus, au R207910, nouvel antibiotique très actif in vitro et in vivo sur les mycobactéries (nouvelle classe d'antibiotiques : les diarylquinolines).

Nous avons en 2006 déterminé les régions de la sous-unité C impliquées dans l'interaction avec le R207910 en sélectionnant une collection de mutants de *M. tuberculosis*, et montré que tous les mutants contenaient une mutation dans la sous-unité C au niveau des acides aminés 32, 63 ou 66 qui sont localisés au voisinage du résidu Glu 61 qui est le résidu catalytique essentiel pour le transfert des protons qui permettent la synthèse d'ATP.

Nous avons poursuivi en 2007 l'étude de ce mécanisme d'action nouveau et en corollaire les mécanismes de résistance acquise. Afin de caractériser plus finement les interactions entre l'ATP synthase et les diarylquinolines, nous avons poursuivi le travail selon 3 approches :

(1) sélection de nouveaux mutants à partir de la souche de référence H37Rv de *M. tuberculosis* (n=25) et de 3 souches cliniques de *M. tuberculosis* (n=26) en présence de concentrations croissantes de R207910.

(2) travail similaire sur les mycobactéries à croissance rapide *M. abscessus*, *M. fortuitum* et *M. smegmatis*.

(3) mise au point d'un système isogénique chez *M. smegmatis* permettant de comparer les niveaux de résistance conférés par les mutations obtenues à ce jour à partir des différentes mycobactéries mentionnées ci-dessus. Chaque gène mutant a été cloné dans le vecteur pLYG204.zeo épisomique. Les plasmides recombinants ont été transformés chez *M. smegmatis* et le niveau de résistance associé à chaque mutation a été évalué comparativement par mesure des CMI du R207910.

Résultats

(1) la proportion de mutants obtenus est la même quelque soit la souche ou l'espèce

(1) Nous avons retrouvé chez *M. tuberculosis* la mutation A63P déjà connue et identifié 2 nouvelles mutations aux positions 59 et 61. Plusieurs mutants de *M. abscessus* et *M. fortuitum* avaient une



mutation non encore décrite (aspartate-32 en alanine). L'ensemble de ces résultats confirme que la zone d'interaction de la DARQ avec la sous-unité C est localisée au niveau du Glu61 et que l'inhibition par la molécule se fait bien au niveau du site de transport des protons (le site du Glutamate-61).

(2) L'introduction du plasmide portant le gène muté correspondant à la mutation I66M (isoleucine 66 → méthionine) dans une souche de *M. smegmatis* sauvage (CMI = 0.7 µg/ml) confère à cette souche une résistance à R207910 avec une CMI (8 µg/ml) comparable à la CMI des mutants chromosomiques I66M de *M. smegmatis* (CMI = 8-16 µg/ml). Nous avons aussi observé un haut niveau de résistance pour la souche de *M. smegmatis* dans laquelle nous avons introduit la construction pLYG204-*atpE*^{E61D} portant le gène *atpE* muté correspondant à la position E61D (CMI = 4 µg/ml). Ces résultats montrent que la méthode est opérationnelle. Les expériences visant à évaluer le niveau de résistance conféré par les autres mutations sont en cours.

Etudes des mécanismes de résistance à l'isoniazide chez *M.tuberculosis*

Objectif : poursuivre la caractérisation des mécanismes de résistance des souches résistantes à l'INH qui ne présentent aucune des deux mutations les plus fréquentes (S315T dans KatG et -15 c->t dans le promoteur d'*InhA*)

Résultats : l'analyse de la séquence complète des gènes *katG*, *inhA* et du promoteur *inhA* a permis d'identifier une dizaine de mutations nouvelles dans KatG, mutations pour lesquelles le rôle dans l'activité de l'enzyme et dans la résistance à l'INH n'a jamais été caractérisé. Ces mutations se répartissent tout au long de la protéine KatG, sans affecter plus spécifiquement un site particulier sur la séquence de la protéine :

Nous poursuivons l'analyse des mutants par une étude biochimique visant à établir le rôle que joue chaque mutation dans la résistance à l'INH.

Détection moléculaire de la résistance à la clarithromycine chez les mycobactéries atypiques

Objectif : mise au point d'un test moléculaire pour étudier la sensibilité à la clarithromycine des espèces naturellement sensibles à cet antibiotique qui joue un rôle essentiel dans le traitement, c'est-à-dire *M.avium* complex et *M.abscessus/chelonae*. Ce test est basé sur l'amplification et le séquençage de la région V de l'ARN 23S en vue de rechercher les mutations entraînant la résistance à la clarithromycine (mutations A2058C, A2058G, A2059C et A2059G dans la numérotation de *E.coli*).

Résultats : l'étude de souches résistantes de *M.avium* et *M.intracellulare* (n=5), *M.abscessus* (n=2) et *M.simiae* (n=1) a montré que 7 avaient des mutations aux positions 2058 ou 2059 de l'ARN 23s. Une souche de bas niveau de résistance n'avait pas de mutation à ces positions et un autre mécanisme est à l'étude. Aucune mutation n'a été détectée dans l'ARN23S des souches sensibles (CMI < 8 mg/l) prises comme témoins.

Ces résultats montrent que les mutations A2058C, A2058G, A2059C et A2059G dans le gène de l'ARN 23S sont impliquées dans la résistance des mycobactéries atypiques à la clarithromycine dans de nombreuses espèces ce qui en fait un test à priori robuste.

Etude du mécanisme de résistance aux fluoroquinolones

Objectif 1 : explorer par des outils moléculaires les souches de *M. tuberculosis* MDR pour savoir rapidement si est ou non sensible 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.

Résultats

Nous avons identifié une double mutation (GyrAT73A + A83E) de l'ADN gyrase non encore décrite dans une souche MDR isolée chez un patient originaire du Congo). Parce que l'implication de cette mutation dans la résistance est inconnue, nous avons construit séparément les mutants A83E, T73A et T73A + A83E de *gyrA* par mutagenèse dirigée et les avons produits par génie génétique chez *E. coli*. Les concentrations de quinolones inhibant 50% (CI₅₀) du surenroulement de l'ADN de la gyrase A83E sont 20 à 40 fois plus élevées que celle de l'enzyme sauvage mais celles de l'enzyme T73A sont deux fois plus faibles que celles de l'enzyme sauvage ce qui va dans le sens d'une hypersensibilité. Les CI₅₀ de



l'enzyme T73A + A83E sont seulement 3-4 fois plus élevées que l'enzyme sauvage, suffisant pour entraîner la résistance aux quinolones, le haut niveau de résistance due à la mutation A83E (jamais décrit seul) étant en partie atténué par T73A.

Objectif 2 : expression et purification de l'ADN gyrase de *Mycobacterium leprae* et étude de son inhibition par les quinolones. En effet, les fluoroquinolones sont les seuls nouveaux antibiotiques efficaces dans le traitement de la lèpre. Parce que *M. leprae* n'est pas cultivable *in vitro*, tester sa sensibilité aux antibiotiques requiert de longues expériences chez la souris.

Résultats : nous avons développé en 2006 un système d'expression *in vitro* des gènes *gyrA* et *gyrB* codant pour l'ADN gyrase de *M. leprae* qui constitue un outil simple pour évaluer rapidement l'activité des quinolones sur cette mycobactérie. Nous avons mis cet outil à profit pour étudier de façon systématique l'implication dans la résistance acquise de *M. leprae* aux quinolones de toutes les mutations décrites dans les gyrases de souches médicales. Nous avons montré que les mutations dans GyrA (A83V et G81C) sont impliquées dans la résistance acquise aux fluoroquinolones à un degré similaire à ce que nous avons décrit chez *M. tuberculosis*. En revanche, la mutation dans GyrB D183N n'est pas impliquée dans la résistance, ce qui est intéressant car (a) la souche a été déclarée résistante sur la seule notion d'une absence d'amélioration du patient alors que celui-ci était traité par ofloxacin et (b) l'acide aminé 183 est situé hors de la QRDR, zone « chaude » d'interaction avec les fluoroquinolones et où se groupent les mutations causant la résistance.

Chimiothérapie expérimentale

Tuberculose

Diarylquinoline R207910

Objectifs : étudier l'activité bactéricide initiale (premières semaines mimant l'activité bactéricide initiale ou Early Bactericidal Activity)) et tardive (après 1 mois de traitement standard, reflétant l'activité sur les bacilles persistants) du R207910 dans le modèle murin. Le R207910 est le chef de file d'une nouvelle famille d'antituberculeux, les diarylquinolines, au mécanisme d'action original (inhibition de l'ATP synthase), très actif sur *M. tuberculosis* *in vitro* et chez la souris.

Des souris swiss femelles âgées de 4 semaines ont été infectées par voie intra-veineuse *M. tuberculosis* H37Rv. Le traitement a débuté 3 jours après l'infection pour la première expérience et quatorze jours après pour la seconde.

Résultats : (1) l'activité du R207910 ne se manifeste après 4 jours de traitement et sa supériorité sur l'isoniazide est évidente après une semaine de traitement. En revanche, lorsque la diarylquinoline est combinée au pyrazinamide, l'activité bactéricide se manifeste dès le 2^{ème} jour de traitement ; (2) durant la seconde phase du traitement (après 1 mois de traitement standard) le R207910 est plus actif que l'isoniazide et aussi active que la rifampicine, antibiotique de référence pour cette phase du traitement (dite phase de « continuation » ou de « stérilisation ») ; (3) en termes quantitatifs, le R207910 a la même activité bactéricide durant les phases initiale et de continuation.

Ces résultats (1) expliquent les résultats décevants du R207910 par rapport à l'isoniazide et la rifampicine constatée après 4 jours chez l'homme (bactéricidie précoce). L'activité du R207910 est retardée probablement en raison de sa longue demi-vie (1 semaine chez l'homme, 24h chez la souris) et (2) démontrent son potentiel pour réduire la durée du traitement et traiter l'infection tuberculeuse latente en raison de sa très bonne activité bactéricide du R207910 sur les bacilles « persistants », c'est-à-dire les bacilles ayant déjà été soumis à 1 mois de traitement standard.

Evaluation de l'efficacité de la moxifloxacine pour le traitement des tuberculoses à bacilles résistants à l'ofloxacin

Objectifs : évaluer l'efficacité de la moxifloxacine sur des souches de *M. tuberculosis* de différents niveaux de résistance aux fluoroquinolones (souches XDR). En effet, en cas de résistance aux fluoroquinolones, la résistance est croisée entre toutes les molécules, mais à des degrés divers. Pour certaines souches résistantes aux fluoroquinolones, les CMI de la moxifloxacine restent inférieures à son



pic sérique. La moxifloxacine pourrait donc conserver un certain degré d'activité *in vivo* sur certaines souches permettant son utilisation dans le traitement des infections XDR.

Résultats : à partir de la souche de référence sensible virulente H37Rv nous avons sélectionné *in vivo* des mutants résistants aux fluoroquinolones, caractérisés les mutations impliquées, évalué la virulence de ces souches et mesuré la CMI des fluoroquinolones sur ces souches : CMI moxifloxacine sur la souche sauvage = 0,25 mg/l, souche mutée en GyrB D426N, 0,5 mg/l, souche mutée en GyrA A83V, 2mg/l et souche mutée en GyrA D87G 4mg/l.

In vivo chez la souris, en un mois de traitement, la moxifloxacine a (1) conservé son activité sur la souche GyrB D426N lorsque sa posologie était doublée, (2) prévenu partiellement la mortalité sur la souche GyrA A83V lorsqu'elle a été utilisée aux posologies les plus élevées, sans toutefois conserver d'activité bactéricide et (3) a été inactive sur la souche GyrA D87G.

Nous avons confirmé qu'une AUC (AUC/CMI) > 100 était corrélée avec une bonne activité *in vivo* de la moxifloxacine. Pour les posologies pour lesquelles l'AUC était < 100, le rapport pic/CMI était corrélé à l'activité. Chez l'homme, la moxifloxacine pourrait donc être active sur les souches présentant des CMI inférieures à son pic sérique à condition d'être administrée à une posologie double, en une prise par jour.

Ulcère de Buruli

Objectifs : mesurer l'activité stérilisante dans le modèle murin de l'ulcère de Buruli (infection à *Mycobacterium ulcerans*) (a) des combinaisons entièrement orales de rifampicine et moxifloxacine, rifampicine et clarithromycine, moxifloxacine et clarithromycine et (b) de la rifapentine, rifamycine à longue demi-vie, qui pourrait permettre une administration intermittente du traitement. La combinaison rifampicine-streptomycine recommandée par l'OMS est très efficace mais pose des problèmes organisationnels dans les zones d'endémie du fait de la nécessité d'une injection intra-musculaire quotidienne pendant 8 semaines qui de plus, expose au risque de transmission virale.

Résultats : (1) aucune souris traitées par rifampicine-clarithromycine n'a rechuté 3 mois après l'arrêt du traitement, alors que 59% de celles traitées par moxifloxacine-clarithromycine ont rechuté. La rifampicine apparaît donc être indispensable pour le traitement de l'ulcère de Buruli. Les combinaisons contenant de la rifapentine administrées 2 jours sur 7 ou 5 jours sur 7 avaient une activité bactéricide ou stérilisante équivalente à celles des combinaisons contenant de la rifampicine administrée 5 jours sur 7.

Un traitement entièrement oral comprenant de la rifampicine et de la clarithromycine est donc aussi efficace chez la souris que le traitement de référence nécessitant des injections d'aminosides. Un traitement intermittent comprenant de la rifapentine administré 2 jours sur 7 est aussi efficace qu'un traitement comportant de la rifampicine administré 5 jours sur 7.

7. Liste des publications et communications

Publications internationales

N. VEZIRIS, C. MARTIN, F. BROSSIER, F. BONNAUD, F. DENIS, A. AUBRY. Treatment failure in a case of extensively drug-resistant tuberculosis associated with selection of a GyrB mutant causing fluoroquinolone resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007, 26(6): 423-5.

KHUË PM, MALLETT A, VEZIRIS N, JARLIER V, ROBERT J; FOR THE AZAY-MYCOBACTERIA STUDY GROUP. Evaluation of data quality in a laboratory-based surveillance of *M. tuberculosis* drug resistance and impact on the prevalence of resistance: France, 2004. *Epidemiol Infect*. 2007 Nov 21:1-7

JI B, CHAUFFOUR A, ROBERT J, LEFRANÇOIS S, JARLIER V. Orally administered combined regimens for treatment of *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3737-9.

KHUË PM, TRUFFOT-PERNOT C, TEXIER-MAUGEIN J, JARLIER V, ROBERT J. A 10-year prospective surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in France 1995-2004. *Eur Respir J*. 2007 Nov;30(5):937-44.



MATRAT S, PETRELLA S, CAMBAU E, SOUGAKOFF W, JARLIER V, AUBRY A. Expression and purification of an active form of the *Mycobacterium leprae* DNA gyrase and its inhibition by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 May;51(5):1643-8.

UFFREDI ML, TRUFFOT-PERNOT C, DAUTZENBERG B, RENARD M, JARLIER V, ROBERT J. An intervention programme for the management of multidrug-resistant tuberculosis in France. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Apr;29(4):434-9.

IBRAHIM M, ANDRIES K, LOUNIS N, CHAUFFOUR A, TRUFFOT-PERNOT C, JARLIER V, VEZIRIS N. Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Mar;51(3):1011-5.

LEFRANÇOIS S, ROBERT J, CHAUFFOUR A, JI B, JARLIER V. Curing *Mycobacterium ulcerans* infection in mice with a combination of rifampin-streptomycin or rifampin-amikacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Feb;51(2):645-50.

CHEMARDIN J, PATY MC, RENARD-DUBOIS S, VEZIRIS N, ANTOINE D. Contact tracing of passengers exposed to an extensively drug-resistant tuberculosis case during an air flight from Beirut to Paris, October 2006. *Euro Surveill.* 2007 Dec 6;12(12):E071206.2.

Publications nationales

J. ROBERT, N. VEZIRIS, C. TRUFFOT-PERNOT, C. GRIGORESCU, V. JARLIER. Surveillance de la résistance aux antituberculeux en France : données récentes. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 2007 (11):91-92.

Communications nationales

S. MATRAT, E. CAMBAU, V. JARLIER, A. AUBRY Etude du rôle des mutations de l'ADN gyrase de souches cliniques de *Mycobacterium leprae* dans la résistance aux fluoroquinolones.. Journées internationales de Mycobactériologie de Langue Française. Lyon. 2007.

J. POISSY, A. AUBRY, V. JARLIER, N. VEZIRIS Evaluation *in vitro* de l'activité de la moxifloxacine sur des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à l'ofloxacine..Journées internationales de Mycobactériologie de Langue Française. Lyon. 2007.

BROUTIN, AL. BANULS, N. KECK, A. AUBRY, E. CAMBAU, P. STAGIER, F. PORTAELS, D. TERRU, P. VAN DE PERRE, S. GODREUIL. Etude de la diversité génétique de *Mycobacterium marinum* chez l'homme et le poisson en France. V. Journées internationales de Mycobactériologie de Langue Française. Lyon. 2007

Communications internationales

W. SOUGAKOFF, G. MILLOT, C. TRUFFOT-PERNOT, N. VEZIRIS, F. BROSSIER, V. JARLIER. Evaluation of a new version of the "RT-TB" triplex real-time PCR assay for the rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich, 2007S.

MATRAT, S. PETRELLA, E. CAMBAU, W. SOUGAKOFF, V. JARLIER, A. AUBRY. *Mycobacterium leprae* DNA gyrase: expression, purification, inhibition by quinolones and functional analysis of two mutant enzymes. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich. 2007AUBRY, A. CHAUFFOUR, C. TRUFFOT-PERNOT, V. JARLIER, N. VEZIRIS. Emergence of fluoroquinolone resistance in the murine model of tuberculosis 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich. 2007.S.

MATRAT, E. CAMBAU, V. JARLIER, A. AUBRY. Function of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase requires the excision of the intein. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago. 2007



N. VEZIRIS, M. IBRAHIM, C. TRUFFOT-PERNOT, K. ANDRIES, V. JARLIER. R207910 Containing Regimens Display High Sterilizing Activity in the Murine Model of Tuberculosis 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago. 2007

Conférences sur invitations

JARLIER V. Multiresistant tuberculosis. 9th European Congress of Chemotherapy, Budapest May 2007

ROBERT J. Surveillance de la résistance aux antibiotiques : l'expérience de l'ONERBA. In « Les méthodes de détection et de surveillance des résistances bactériennes ». Séminaire de formation organisé par le Ministère de la Santé Publique, Commission Nationale pour la Surveillance des Résistances Bactériennes et Société Tunisienne de Biologie Clinique. Tunis, Tunisie 8-10 mars 2007.

Jl B. Further Identification of Orally Administered Combined Regimens for Treatment of *Mycobacterium ulcerans* Infection in Mice. WHO Annual Meeting on Buruli Ulcer, 2-4 April 2007, Geneva, Switzerland.

Jl B. Footpad Model of Immune-competent Mice for *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium ulcerans* infection. To be presented at the Scientific Advisory Committee of the Leonard Wood Memorial, 23-24 Oct. 2007, Cebu, Philippines.

8. Programme d'activité 2008-2009

En matière d'expertise :

(a) consolider la remontée vers le CNR-MyRMA des souches de *M.tuberculosis* complexe des espèces peu fréquentes qui constituent des indicateurs épidémiologiques : *M.bovis* (lien animal/homme) et *M.bovis* BCG (complications de la vaccination).

(b) maintenir la quasi exhaustivité du recueil des souches multirésistantes et ultrarésistantes.

En matière d'outils diagnostiques :

(a) améliorer la performance des tests moléculaires de détection des résistances de *M.tuberculosis* à l'isoniazide et au pyrazinamide, en nous basant sur les résultats de la recherche sur les mécanismes de résistance.

(b) achever la mise au point de la trousse de détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques antituberculeux et évaluer ses performances. Dans ce cadre, le CNRMyRMA participera au projet OMS de surveillance de la résistance aux antituberculeux aux côtés de 6 autres laboratoires : Yonsei Univ College of Medicine (Seoul, Corée du sud), Central JALMA institute for leprosy (Agra, India), Unité de génétique moléculaire (Institut Pasteur Paris), Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brésil), Laboratory National Hansen's disease (Baton Rouge, USA).

(c) poursuivre le développement de méthodes pour rechercher dans l'environnement hydrique les mycobactéries non tuberculeuses par approche bactériologique classique (cultures) et par biologie moléculaire basée sur l'amplification en temps réel d'un gène conservé entre les mycobactéries mais dont la séquence diffère suffisamment des autres mycobactéries (candidats : *hsp*, *rpoB*, *sodA*, *rrs*).

(d) mener à bien 2 projets visant à évaluer la réponse immunitaire à *M.tuberculosis* par mesure de la production d'interféron gamma (Quantiferon-Gold et T-SPOT.TB), ainsi que les conditions d'utilisation de ces tests :

- projet STIC 2007 (Stratégies thérapeutiques innovantes coûteuses) visant à évaluer l'impact sur la prise en charge, des tests dans les situations à risque de tuberculose chez les patients de plus de 15 ans, selon 3 axes :



- (1) dépistage de la tuberculose latente avant traitement anti-TNF
- (2) dépistage de la tuberculose latente ou maladie chez des patients infectés par le VIH
- (3) dépistage de la tuberculose latente chez des personnels hospitaliers exposés

Ce projet est coordonné par Ghislaine Carcelain (Immunologie cellulaire, Pitié-Salpêtrière) et implique 11 CHU de province et 7 hôpitaux de l'AP-HP. Le CNR-MyRMA fait partie du conseil scientifique du projet et est directement impliqué dans la mise en œuvre de l'axe 3.

- projet sélectionné de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et de (AFSSET) « Expositions des soignants à *Mycobacterium tuberculosis* (projet TUBEXPO). Ce projet vise à mesurer l'exposition des personnels soignants (PS) à la tuberculose. C'est un complément du projet STIC qui, lui, permettra de mesurer la réponse immune elle-même par les tests basés sur l'interféron gamma. L'objectif principal est de mesurer l'exposition et la durée d'exposition des soignants au bacille tuberculeux. L'étude se déroulera dans les 2 services accueillant le plus de tuberculeux dans les 2 hôpitaux recevant le plus grand nombre de cas à Paris : Bichat-Claude Bernard et Pitié-Salpêtrière.

Ce projet coordonné par Jean-Christophe Lucet (Bichat-CI Bernard) associe le CNR.

(e) organiser une réflexion collective sur les besoins en tests immunologiques et bactériologiques pour la prise en charge de la tuberculose maladie et de la tuberculose latente en France. Cette réflexion sera organisée fin 2008 ou début 2009, comme annoncé à la fin du Colloque « performance et intérêts des nouveaux tests immunologique » organisé en décembre 2006. L'objectif sera de définir les caractéristiques que devraient avoir les tests pour répondre aux exigences des différentes situations pratiques : cas très suspect de tuberculose maladie (microscope +) selon les types de situation (antécédents de traitement, VIH+...), cas suspect de tuberculose maladie (microscope -), cas suspect d'avoir été contaminé par un tuberculeux contagieux (selon les types de situation : âge, pays de naissance...), patient devant être soumis à un traitement immuno-supresseur...

En matière d'appui méthodologique pour la tuberculose multirésistante:

(a) évaluer l'efficacité des 3 principaux types de régimes thérapeutiques : (i) amikacine-moxifloxacine-éthionamide-pyrazinamide (situation la plus favorable), (ii) amikacine-moxifloxacine-cyclosérine-PAS lorsque l'éthionamide et le pyrazinamide sont inactifs (situation médiane) et (iii) régimes sans fluoroquinolones, y compris cas XDR (situation la moins favorable). Cette évaluation portera sur 2 ou 3 ans en raison du nombre limité et de la variété des cas MDR.

(b) quantifier les délais de prise en charge depuis le diagnostic.

(c) améliorer en collaboration avec l'InVS, la base de données des cas MDR dont un prototype a été mis en place en 2006, afin de pouvoir disposer à tout moment des principales informations concernant chaque cas, entre autre pour faciliter la logistique de prise en charge (courriers, rappels, bilans...).

(d) Améliorer la circulation de l'information concernant les patients MDR entre le CNR et les CLAT. Un projet collaboratif avec la Société de Pneumologie de Langue Française sera mis en place en 2008.

En matière d'investigation de cas groupés:

(a) optimiser avec les CLAT, du moins ceux de l'Île de France, la méthodologie de regroupement des cas suspects de transmission et des souches de *M. tuberculosis* correspondants

(b) continuer à rationaliser l'étude des suspicions de contamination de laboratoire dont beaucoup peuvent être résolues par l'analyse des caractéristiques des épisodes ce qui a déjà permis de diminuer le recours aux méthodes génotypiques.

En matière de surveillance en réseau :

(a) chiffrer l'exhaustivité du recensement des cas de tuberculose MDR et XDR au sein du réseau CNR-MyRMA, en croisant toutes les données disponibles (souches MDR connues par le réseau Azay-Mycobactéries, souches MDR reçues par le CNR ...).

c) suivre l'évolution des caractéristiques des cas MDR et XDR afin d'améliorer leur prise en charge,

(d) achever le recensement rétrospectif des cas de méningite tuberculeuse bactériologiquement confirmés chez les enfants de moins de 5 ans,



(e) surveiller les mycobactérioses dans le cadre des modifications de la politique de vaccination par BCG, à travers le réseau Azay-Mycobactéries et les souches reçues par le CNR-MyRMA, en portant une attention particulière aux cas extra-respiratoires (adénopathies, abcès..) survenus chez les enfants de moins de 5 ans (cf. expérience suédoise après l'arrêt du BCG systématique).

En matière de **mécanismes de résistance** :

Poursuivre le travail sur

- (a) le pyrazinamidase afin d'optimiser les performances de la détection moléculaire de la résistance
- (b) les diaryquinolines pour préciser le mécanisme d'inhibition de l'ATP synthase
- (c) l'isoniazide pour définir le rôle des mutations de KatG autres que S315T.

En matière de **recherche thérapeutique** :

- (a) mettre au point un traitement intermittent (uni-hebdomadaire) de la tuberculose
- (b) raccourcir la durée du traitement de la tuberculose à bacilles multirésistants.