



**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

Rapport d'activité pour l'année 2008

Avril 2009



Table des matières

1. INTRODUCTION	4
1.1 MISSIONS.....	4
1.2 ORGANISATION ET REPARTITION DES MISSIONS AVEC LE LABORATOIRE ASSOCIE	4
<i>Equipes</i>	4
<i>Locaux</i>	5
<i>Equipements</i>	5
1.3 DEMARCHE QUALITE	6
1.4 RESUME DES ACTIVITES DE L'ANNEE.....	7
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	9
2.1 CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	9
<i>Liste des techniques disponibles</i>	9
<i>Techniques développées en 2008</i>	9
<i>Collections de souches de référence</i>	11
<i>Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR</i>	11
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2008.....	12
<i>Nombre de souches ou prélèvements réceptionnés</i>	12
<i>Souches identifiées</i>	12
<i>Identification sur prélèvements</i>	13
<i>Souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux</i>	14
<i>Détection de mutations impliquées dans la résistance de M. tuberculosis</i>	15
<i>Expertise en santé animale</i>	17
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	17
3.1. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	17
<i>Les réseaux de partenaires</i>	17
<i>Estimation de la couverture des réseaux ou représentativité, évolution</i>	18
<i>Analyse des caractéristiques du réseau CNR-MyRMA</i>	18
<i>Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS</i>	18
3.2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX.....	19
<i>Définition de l'échantillon de souches testées</i>	19
<i>Définitions utilisées pour exprimer la résistance</i>	20
<i>Résultats globaux et en fonction des critères pertinents</i>	20
3.3. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX	21
<i>Contexte épidémiologique</i>	21
<i>Stratégie et organisation</i>	22
<i>Résultats</i>	22
3.4. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS	24
3.5. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE.....	24
4. ALERTE	24
<i>Tuberculose nosocomiale</i>	24
<i>Infection cutanée nosocomiale à M. chelonae</i>	24
<i>Infection cutanée après carboxythérapie à M. chelonae</i>	24
5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	25
ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS AUX PROFESSIONNELS DE SANTE, ACCUEIL DE STAGIAIRES	25
<i>Enseignements sur la thématique du CNR</i>	25
<i>Formations aux professionnels de santé</i>	26
GUIDES ELABORES (CONTENU, MODES DE DIFFUSION)	26
RETRO-INFORMATION AUX PARTENAIRES	26
ACTIVITES DE CONSEIL AUX PROFESSIONNELS (ORGANISATION DU CNR POUR RECEPIONNER LES APPELS OU EMAILS, VOLUME D'ACTIVITES...)	26
LISTE DES ACTIVITES D'EXPERTISES AUPRES DU MINISTERE CHARGE DE LA SANTE, DE L'INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE, DES AGENCES DE SECURITE SANITAIRE, DE L'HAUTE AUTORITE EN SANTE OU DE STRUCTURE EUROPEENNE (ECDC...) OU INTERNATIONALE (OMS...).....	27
6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	27
RECHERCHES SUR LES MECANISMES DE RESISTANCE DES MYCOBACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES	27
<i>Etudes des mécanismes de résistance au pyrazinamide (PZA) chez M. tuberculosis</i>	28
<i>Etudes des mécanismes de résistance au R207910 chez M. tuberculosis</i>	28



<i>Etudes des mécanismes de résistance à l'isoniazide chez M. tuberculosis</i>	29
<i>Etude du mécanisme de résistance aux fluoroquinolones chez M. tuberculosis</i>	29
CHIMIOThERAPIE EXPERIMENTALE	30
<i>Tuberculose</i>	30
<i>Mise au point d'un modèle expérimental d'infection à mycobactéries à croissance rapide</i>	30
<i>Ulcère de Buruli</i>	31
7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2008	31
PUBLICATIONS INTERNATIONALES	31
PUBLICATIONS NATIONALES	32
COMMUNICATIONS NATIONALES.....	32
COMMUNICATIONS INTERNATIONALES	33
CONFERENCES SUR INVITATIONS	33
8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2009-2010	34



1. Introduction

1.1 Missions

Les missions du CNR-MyRMA ont été définies par le cahier des charges de l'appel d'offre de 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.

1.2 Organisation et répartition des missions avec le laboratoire associé

L'organisation du CNR-MyRMA repose sur :

- un laboratoire coordinateur (Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, responsable Vincent Jarlier)
- un laboratoire associé (hôpital Henri-Mondor, Créteil, responsable Emmanuelle Cambau)

Cette organisation a permis (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.

Une demande a été faite début 2009 à l'InVS de transfert du laboratoire associé de l'hôpital Henri-Mondor vers le Groupe Hospitalier Saint-Louis-Lariboisière, toujours sous la responsabilité d'Emmanuelle Cambau (cf. section programme d'activité 2009-2010).

Equipes

Les fonctions, qualifications, statuts, domaines de compétence des personnes impliquées dans le travail du CNR-MyRMA sont détaillés ci-dessous :

Directeur : Pr Vincent JARLIER ; PU-PH (psl)

Responsable laboratoire associé : Pr Emmanuelle CAMBAU, PU-PH (hmn)

Microbiologie : Dr Nicolas VEZIRIS, MCU-PH (psl) ; Sylvaine BASTIAN PA (psl) ; Lionel DEFORGES MCU-PH (hmn)

Biologie moléculaire : Wladimir SOUGAKOFF, MCU-PH (psl) ; Florence BROSSIER, AHU (psl) ; Dr Alexandra AUBRY, MCU-PH (psl)

Groupe « thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes » Dr Nicolas VEZIRIS (psl)

Surveillance épidémiologique Dr Jérôme ROBERT, MCU-PH (psl) ; Sylvaine BASTIAN (psl)



Chimiothérapie expérimentale Pr Baohong JI (psl); Dr Nicolas VEZIRIS (psl)
Techniciennes : Claudine WICHLACZ (psl), Yamina SLIMANI (psl), Shenaz GOLAMHOSSEN (psl), Murielle RENARD (psl), Jeanne-Marie LE GLAUNEC (hmn), Renée VERGNE (hmn),
Cadre de santé : Christian MERCADIEL (psl)
Secrétariat : Francesca CATALANO (psl)

Locaux

Laboratoire coordinateur : 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 s'y déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité P3 (150 m²) consacré à la mycobactériologie (et aux alertes Biotox).
- 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 s'y 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®)
- 1 caméra de lecture de microplaques (TREK, Sensititre®)

Autres pièces du laboratoire Pitié-Salpêtrière:

- microscopes à fluorescence, microscopes classiques
- matériel d'hybridation/lecture Accuprobe® (BioMérieux)
- extracteur d'acides nucléiques automatisé QIACUBE® (Qiagen)
- extracteur d'acide nucléique automatisé MagNA Pure® (Roche)
- amplificateurs d'ADN classiques pour PCR
- amplificateur automatisé pour PCR en temps réel (Applied Biosystem)
- matériel d'hybridation manuelle pour les trousse de 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 Gene Quant II® (Pharmacia)
- 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,
- spectromètre de masse MALDI-TOF.

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

- 4 isolateurs rigides en pression négative, 8 armoires-isolateurs conventionnelles, 4 isolateurs souples pour maintenance des animaux immunodéprimés
- 2 postes de sécurité microbiologique pour les dissections et cultures, dans une pièce munie d'un sas et réservée à cet usage
- 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®
- matériel d'hybridation manuelle pour les bandelettes InnoGenetics et Hain
- matériel pour génotypage par la méthode RFLP
- matériel pour génotypage par la méthode MIRU-VNTR

1.3 Démarche qualité

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

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

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

Procédure annexe : Prélèvements

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. Les résultats définitifs ont montré que sur les 20 souches reçues notre pourcentage de réponses correctes était de 100% pour l'isoniazide et la rifampicine et de 89% pour l'éthambutol et la streptomycine. Après suppression des souches pour lesquelles il y avait moins de 80% d'agrément entre les laboratoires participant au contrôle, le pourcentage de réponses correctes est de 100% pour les 4 antituberculeux. La reproductibilité était de 100%.

Il n'y a pas eu de contrôle de qualité en 2008 et un prochain contrôle est annoncé pour 2009.



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 de 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 et en 2007. Il n'y a pas eu de contrôle de qualité en 2008 et, nous organisons le prochain en 2009.

1.4 Résumé des activités de l'année

L'activité d'expertise a continué à augmenter en 2008 (1082 souches et prélèvements soit + 50% par rapport à 2005, +4% par rapport à 2006, +2% par rapport à 2007) 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=479 dont 452 souches et 27 prélèvements)
- 11 souches de *Mycobacterium bovis* montrant que la source animale de bacilles tuberculeux est très faible en France
- l'importance au sein des mycobactéries atypiques responsables d'infections (mycobactérioses) de *M. avium* (infections respiratoires, adénites), *M. xenopi* et *M. kansasii* (infections respiratoires) et des espèces à croissance rapide : *M. fortuitum* et *M. abscessus* (infections respiratoires) et *M. chelonae* (infections cutanées, parfois iatrogènes).
- la fréquence (10%) des espèces dites « rares » ou récemment décrites parmi les mycobactéries atypiques dont l'identification n'est possible que par 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 au CNR.

En matière de **tests de sensibilité aux antibiotiques de *M. tuberculosis***, il faut noter (a) la forte proportion (53 % en 2008) des souches reçues au CNR qui sont résistantes à au moins un antituberculeux de 1^{re} ligne et (b) le nombre de souches MDR (n=51 en 2008) qui représentent, sur la base des données de surveillance des dernières années à travers le réseau CNR-MyRMA, au moins 90% des cas MDR identifiés en France (cf section 3 : activités de surveillance).

Le nombre de souches **MDR** reçues, qui avait augmenté de 29 en 2001 à 60 en 2003, est resté stable (40 à 60/an) depuis : 51 en 2006, 38 en 2007 et 51 en 2008, en cohérence avec les données de la surveillance des cas MDR par le réseau CNR-MyRMA. Les souches MDR de 2008 étaient souvent résistantes à la streptomycine (3/4), à l'éthionamide (1/2), à l'éthambutol (1/3) et à la cyclosérine (1/3) mais plus rarement aux aminosides de réserve (10%), fluoroquinolones (14%) et PAS (6%). Le nombre de cas ultrarésistants (**XDR**) de 2008 (n=2) est resté identique à la moyenne de 1 ou 2 cas par an depuis 2002. La proportion de cas XDR parmi les cas MDR a été de 4-5% de 2006 à 2008, c'est-à-dire à peine plus élevée qu'entre 2002 et 2005 (2-3%).

Il n'y a donc pas aujourd'hui de menace de tuberculose multirésistante et ultrarésistante en France

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 en cas de tuberculose MDR). Pour l'isoniazide le CNR-MyRMA a mis en place en routine un test d'amplification-hybridation sur bandelette qui étend le nombre des séquences cibles et augmente le taux de détection moléculaire de la résistance à cet antibiotique qui atteint maintenant 85%. Le séquençage complet des gènes *katG* et *inhA* est nécessaire pour porter presque à 100% le taux de détection. Les activités 2008 ont confirmé la **rareté de la résistance acquise chez les mycobactéries atypiques** (4 souches de *M. avium*, 1 de *M. xenopi* et 6 du groupe *M. abscessus* résistantes aux macrolides).

Les prélèvements reçus pour diagnostic de **lèpre** ont permis de détecter un cas de résistance primaire aux sulfones (Nouvelle-Calédonie).

En matière **d'évaluation des outils diagnostiques**, le CNR-MyRMA a en 2008 (a) poursuivi l'évaluation de la trousse Genotype MTBDR *plus*® qui améliore la détection des souches résistantes à l'isoniazide (de 70 à 85 %), surtout des souches de bas niveau de résistance, (b) poursuivi la mise au



point d'une trousse de détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques antilépreux, (c) poursuivi la mise au point de techniques 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), (d) mis en place une technique de typage moléculaire (MIRU-VNTR 24 loci) basée sur le nombre d'unités répétitives appelées MIRU (Mycobacterial interspersed repetitive units) présentes au sein de 24 sites du chromosome désignés sous le nom de VNTR (Variable Number of Tandem Repeat). Nous avons entrepris l'évaluation en routine du MIRU-VNTR 24 loci dans le cadre d'activités de surveillance du CNR (détection et investigation de cas groupés).

Le CNR-MyRMA a poursuivi en 2008 **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 s'est réuni 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 depuis 2006, par une méthode plus rapide (MIRU-VNTR). Les résultats du travail 2008 (172 souches) ont permis : (a) de confirmer 16 des 24 épisodes de transmission en collectivité suspectés lors d'enquêtes autour des cas, (b) de confirmer 1 des 4 suspicions de transmission nosocomiale (6 cas secondaires à 1 cas index), (c) 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 3 nouveaux cas de tuberculose à une grappe déjà identifiée les années précédentes (foyer Tillier) et, (d) de montrer qu'il n'y avait pas eu d'épidémie de tuberculose MDR en 2008.

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^{ère} ligne stratifiée selon les critères de l'OMS (pays de naissance, antécédents de traitement) à travers le réseau Azay-Mycobactéries (34 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 qu'en 2007, le taux de résistance primaire a été globalement de 10% (7,1% chez les malades nés en France et 11,9% chez ceux nés à l'étranger, $p < 0,01$) et respectivement de 6,5% (4,9% et 7,5% $p = 0,07$) pour l'isoniazide et 1,0% (0,6% et 1,2%, $p = 0,27$) pour la rifampicine,

(b) sur la multirésistance à travers le réseau d'environ 300 laboratoires mis sur pied par le CNR-MyRMA et montré (i) que la proportion de cas MDR était en 2007 de 0,96% ($n = 45$), taux le plus bas observé depuis 2000 et que comme ces dernières années (ii) les malades concernés sont jeunes (âge médian 30 ans), le plus souvent nés à l'étranger (88%) et sans antécédent de traitement (multirésistance « primaire » 68%).

Deux alertes ont concerné des cas d'infections sous-cutanées à *M. chelonae*, menées avec le C-CLIN Paris-Nord, la DDASS, les CIRE Ile-de-France et Puy-de-Dôme et la DGS. Une épidémie nosocomiale de tuberculose (7 cas) survenue dans un CHU de l'AP-HP a fait l'objet d'une investigation par l'équipe d'Hygiène de l'AP-HP, le C-CLIN Paris-Nord, la DDASS et la DGS.

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

En matière de **recherche thérapeutique**, nous avons en 2008 (a) poursuivi l'évaluation de l'activité in vivo des diarylquinolines dans la tuberculose murine en se focalisant sur la mesure de l'activité bactéricide d'associations ne comportant ni isoniazide ni rifampicine (conditions de tuberculose multirésistante, (b) évalué l'activité in vivo dans le modèle d'ulcère de Buruli de traitements entièrement oraux à base de rifampicine (ou rifapentine), clarithromycine et moxifloxacine et de plusieurs rythmes d'administration du traitement standard OMS (streptomycine et rifampicine), et (c) mis au point un modèle murin d'infection à *M. abscessus* qui permettra d'évaluer l'efficacité des antibiotiques.



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®)
- Hybridation 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 2ème ligne (kanamycine, amikacine, capréomycine, fluoroquinolones, thioamides, cyclosérine, PAS, linézolide et thiactazone) n'étant plus commercialisés, sont préparés et contrôlés au laboratoire.
- Méthode des proportions pour *M. kansasii*, sur milieux de L.Jensen industriels (isoniazide, éthambutol) ou fabriqués et contrôlés au laboratoire (rifampicine) car les milieux industriels contiennent non pas de la rifampicine vraie mais de la rifamycine SV (auquel *M. kansasii* est naturellement résistant).
- Détermination des CMI en milieu de L. Jensen (clarithromycine, fluoroquinolones, éthambutol, rifabutine). Ces milieux, non disponibles dans le commerce, sont préparés et contrôlés au laboratoire.
- Détermination des CMI en milieu liquide sur microplaque (Trek®) pour les mycobactéries à croissance rapide.
- Détermination des CMI par bandelettes E-test pour les mycobactéries à croissance rapide.
- Pour *M. leprae* : inoculation dans le coussinet plantaire de 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^{plus}® 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 chez *M. tuberculosis*, *M. leprae* et les mycobactéries atypiques : *rpoB*, *katG*, *inhA*, région régulatrice *inhA*, *pncA*, *gyrA*, *gyrB*, ARN 23s, *foIP*

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: CMI, étude de la bactéricidie.
- Méthodes in vivo : modèles de chimiothérapie expérimentale chez la souris pour *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. avium*.

Techniques développées en 2008

CMI en microplaques



La détermination des CMI en milieu liquide en microplaque (Trek, Sensititre®) a été introduite en 2008 pour les mycobactéries à croissance lente. Elle permet d'obtenir plus rapidement des résultats plus précis, qui peuvent être interprétés selon des recommandations (CLSI).

Typage moléculaire *M. tuberculosis* par technique MIRU-24

Le typage moléculaire des bactéries du complexe *M. tuberculosis* (MTBC) à des fins épidémiologiques permet d'étudier la transmission et la propagation de génotypes spécifiques. En 2008, la technique de typage moléculaire génomique de *M. tuberculosis* par MIRU-VNTR 24 loci a été implantée au CNR en remplacement de la méthode de détermination des empreintes digitales génomiques par polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) que nous utilisions jusque là, technique de référence mais qui progressivement est abandonnée en raison de sa lourdeur. Le typage MIRU-VNTR 24 loci consiste à déterminer le nombre d'unités répétitives appelées MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) présentes au sein de 24 sites du chromosome désignés sous le nom de VNTR (Variable Number of Tandem Repeat). La technique mise en place est l'adaptation du protocole MIRU-VNTR utilisant 24 marqueurs MIRU, selon les recommandations publiées en 2008 par Allix-Béguet et coll. (Allix-Béguet C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann, S. *Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol* 2008, 46(8):2692-9). Cette technique est aujourd'hui commercialisée sous forme d'un kit par la société GenoScreen basée à Lille.

En raison du format des données générées par la technique MIRU, code à 24 chiffres aisé à gérer dans une base de données, cette technique a le potentiel d'être utilisée comme outil polyvalent pour établir et interpréter des bases de données au niveau Européen.

Le programme « **MIRU-VNTRplus** web application », disponible sur le site www.miru-vntrplus.org permet de comparer les résultats MIRU-VNTR des souches étudiées avec une base de données de 186 souches bien caractérisées (lignée et principales caractéristiques génétiques connues) et permet de calculer des dendrogrammes linéaires ou radiaux, de construire un « minimum spanning tree » (MST) indiquant les clusters MIRU et de situer sur une carte la répartition géographique des souches.

En 2008, nous avons participé à Lille à une formation MIRU-VNTR. Cette formation a été encadrée par P. Supply et C. Allix-Béguet, co-développeurs de la méthode MIRU-VNTR. La formation a été suivie par une phase de mise en place de la technique sur le site du CNR-MyRMA, et d'une validation des performances par l'analyse d'une vingtaine de souches contrôles dont le code MIRU était connu.

Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

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

L'amplification génique et hybridation sur bandelette Genotype MTBDR PLUS® pour la détection des mutations causant la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide introduite en 2007 en raison de ses meilleures performances pour détecter la résistance à l'isoniazide a été évaluée sur les cas de 2008. Les résultats de l'évaluation ont montré que (a) cette trousse permet de détecter en routine 100% des souches résistantes à la rifampicine et 85% des souches résistantes à l'isoniazide (b) 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 donc que le nombre de cas de résistance à l'isoniazide non détectés par ce test parmi 100 cas de tuberculose est acceptable ($n < 1$) lorsque la prévalence de la résistance est <5% mais est inacceptable ($n > 4$) lorsqu'elle la prévalence est supérieure à 30% (Brossier F et al. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009 Feb;13(2):260-5).

Techniques en développement : principes et état d'avancement

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

En 2008, nous avons poursuivi le développement d'une nouvelle trousse de détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques antilépreux (sulfamides, rifampicine, fluoroquinolones) menée en collaboration avec les Laboratoires Hain Lifescience (Nehren, Germany) et l'Ordre de Malte (programme MAGRALEPRE). 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 2008 ont été :

- La mise au point des conditions d'amplification et d'hybridation au laboratoire du CNR-MyRMA
- L'évaluation des performances du prototype fabriqué par Hain (trousse GenoType® LepraDR) par comparaison des résultats d'hybridation avec les résultats a) de séquençage des gènes et b) de sensibilité obtenus selon la méthode de culture chez la souris
- La démonstration de l'applicabilité sur les biopsies cutanées de lépromes.

Technique de recherche de mycobactéries atypiques dans l'eau (projet Aquamyc)

En 2008, nous avons poursuivi la mise au point de méthodes de détection et de dénombrement des mycobactéries à partir de l'eau, 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), 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), et l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées. Le programme (2007-2010) vise à pouvoir identifier les sources et réservoirs des mycobactéries non tuberculeuses, dans le bassin versant de la Seine (projet Aquamyc) et à suivre leur dynamique temporelle.

Nous avons finalisé en 2008 la mise au point des procédures d'échantillonnage, de détection et de dénombrement dans l'eau par méthode bactériologique. Deux procédures différentes ont été mises au point :

- l'une pour l'étude des eaux propres : concentration des bactéries par filtration, pas d'étape de décontamination, et culture sur milieux contenant des antibiotiques
- l'autre pour l'étude des eaux sales : concentration des bactéries par centrifugation, décontamination à la soude, culture sur milieux contenant des antibiotiques et des antifongiques à forte concentration.

En 2008, nous avons aussi entrepris la mise au point d'une méthode de détection moléculaire basée sur l'amplification de séquences spécifiques des gènes de mycobactéries par PCR en temps réel puis identification par séquençage. Cette méthode nécessite encore d'être améliorée en particulier pour les étapes d'extraction des acides nucléiques et de la quantification.

Enfin, en 2008 nous avons entrepris la création d'une collection de souches de mycobactéries non tuberculeuses isolées d'eau de la Seine. Chaque souche a été identifiée sur la base des séquences de gènes conservés (*rrs*, *hsp*). Cette collection nous permettra de mesurer la sensibilité et la spécificité des gènes choisis pour détection par méthode moléculaire (cf. ci-dessus).

Ce travail fait l'objet de la Thèse de Sciences de Nicolas Radomski, étudiant à l'Université Paris 12 et à l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées.

Collections de souches de référence

Le CNR-MyRMA a 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 pour les antibiogrammes de *M. tuberculosis*), 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

- Microscopie à fluorescence
- Cultures en milieu solides et liquides
- Identification des cultures par hybridation directe avec sonde Accuprobe® ou amplification-hybridation sur bandelettes (Genotype®...)



- Identification de *M.tuberculosis* par amplification génique directement à partir des prélèvements lorsque 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 tuberculose suspecte de multirésistance (antécédents de traitement, séropositivité VIH, malade originaire d'un pays à forte prévalence de résistance...)
- Génométypage des souches de *M. tuberculosis* par RFLP ou MIRU-VNTR 24 loci en cas de suspicion de cas liés (enquête autour d'un cas, épidémies...).

2.2 Activités d'expertise en 2008

Nombre de souches ou prélèvements réceptionnés

Au cours de l'année 2008 le CNR-MyRMA a reçu **967 souches et 115 prélèvements (total 1082)** pour identification et/ou typage moléculaire et/ou étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Parmi les **967 souches** reçues :

- 17 souches contaminées n'ont pu être étudiées
- 6 souches ont été identifiées comme des espèces non mycobactériennes
- **944 souches (98% 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. Les souches proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et TOM-DOM (laboratoires hospitaliers, LABM...).

Parmi les **115 prélèvements** reçus pour mise en culture et/ou pour amplification génique :

- 79 prélèvements ont été mis en culture par méthode classique : 65 de ces 79 prélèvements (soit 82%) ont donné une culture positive à mycobactéries.
- 52 ont été soumis au diagnostic de tuberculose par amplification génique (PCR) et 27 au diagnostic moléculaire de la résistance à l'isoniazide et à la rifampicine.

Souches identifiées

Les **944 souches identifiées** se répartissent en **452 souches du complexe *M. tuberculosis* (48%)** et **492 souches de mycobactéries atypiques (52%)**.

Parmi les **452 souches de *M. tuberculosis* complexe** il y a eu 4 souches de *M. bovis* var BCG, **11 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 **11 souches de *M. africanum*** (stable par rapport à 2007).

Parmi les **492 souches de mycobactéries atypiques** :

- **148 souches (30% du total) du complexe *M. avium*** (en 2007 n=154, 35 % du total). La proportion de ces souches qui ont été considérées comme responsables d'infections (n=105 soit 71% dont 7 adénites chez des enfants de moins de 5 ans) est élevée, en cohérence avec la volonté du CNR de concentrer ses efforts sur les souches importantes sur le plan médical.
- **66 souches de *M. xenopi*** (13% du total). L'ensemble de ces souches sauf deux provenait de sécrétions respiratoires. Les 2 souches d'origine extra-respiratoire ont été isolées de prélèvements de genou. La première chez un patient aux antécédents de multiples infiltrations articulaires et la seconde chez un patient déjà connu en 2006 pour lequel le diagnostic d'infection n'avait à l'époque pas été retenu et qui n'avait donc pas donné lieu à un traitement (l'origine de l'infection pourrait être une plaie du genou datant de plusieurs années). Parmi les 64 souches respiratoires, 39 (61%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **21 souches de *M. kansasii*** (4% du total), agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose.
- **165 souches d'espèces à croissance rapide** (16% du total) réparties dans les espèces *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. aubagnense*, *M. bolletii*, *M. massiliense*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum* et *M. phocaicum*. 53 de ces 165 souches (32%) ont été considérées comme responsables d'infections, le plus souvent respiratoires dans le cadre de la mucoviscidose pour *M. abscessus* et cutanées pour *M. chelonae*



- **10 souches de *M. marinum***, agent classique d'infections cutanées après inoculation à partir d'aquarium ou d'animaux aquatiques (pas de cas groupés faisant craindre une exposition commune).

- **25 souches d'espèces non pathogènes**, qui correspondent à des souillures (5% du total) et appartiennent pour l'essentiel à l'espèce *M. gordonae* (n=21, 4% 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.

- **Il faut noter 52 souches d'espèces rares ou nouvellement décrites :**

. 12 souches de *M. massiliense* (espèce proche de *M. abscessus* décrite en 2004) isolées de prélèvements respiratoires de 10 malades et d'un prélèvement de cornée chez un malade. Dans tous ces cas, cette espèce a été considérée comme pathogène.

. 6 souches de *M. arupense* (espèce proche de *M. terrae* décrite en 2006) dont 4 d'origine clinique. Sur ces 4 souches, 2 ont été considérées responsables d'infection : 1 infection respiratoire et 1 phlegmon des fléchisseurs de la main après une plaie chez un agriculteur.

. 5 souches de *M. phocaicum* (espèce proche de *M. abscessus* décrite en 2006) isolées de prélèvements d'environnement.

. 5 souches de *M. bolletii* (espèce proche de *M. abscessus* décrite en 2006) isolées de 5 malades, dont 2 ont été considérées responsables d'infection : 1 infection respiratoire et 1 abcès dentaire.

. 4 souches de *M. celatum* (mycobactérie proche du complexe aviaire décrite en 1993) isolées de 4 malades, dont 2 ont été considérées responsables d'infection respiratoire : 1 chez un patient ayant des bronchectasies et 1 chez un patient séropositif pour le VIH.

. 4 souches de *M. lentiflavum* (mycobactérie proche de *M. simiae* et *M. genavense* décrite en 1996) isolées de 4 malades, dont 1 a été considérée responsable d'infection respiratoire chez un patient atteint de mucoviscidose.

. 3 souches de *M. immunogenum* (mycobactérie à croissance rapide décrite en 2001) isolées de l'environnement.

. 2 souches de *M. novocastrense* (mycobactérie à croissance rapide décrite en 1997) isolées chez 2 malades et non considérées responsable d'infection.

. 2 souches de *M. houstonense* (mycobactérie à croissance rapide proche de *fortuitum* décrite en 2004), 1 isolée de l'environnement et 1 d'un ganglion cervical chez un malade et donc considérée comme responsable d'infection.

. 1 souche de *M. kubicae* (mycobactérie proche de *M. asiaticum* décrite en 2006) isolée à deux reprises chez un même malade mais considérée comme un contaminant.

. 2 souches de *M. chimaera* (mycobactérie proche de *M. avium* décrite en 2004) isolée de prélèvements respiratoires chez deux malades et considéré responsable d'infection.

. 1 souche de *M. ulcerans*, agent de l'ulcère de Buruli, isolée de lésions cutanées chez une patiente contaminée en Côte d'Ivoire.

. 1 souche de *M. aubagnense* (espèce proche de *M. abscessus* décrite en 2006) isolée de l'environnement

. 1 souche de *M. brisbanense* (espèce proche de *M. fortuitum* décrite en 2004) isolée d'un prélèvement respiratoire et considérée comme un contaminant

. 1 souche de *M. frederikbergense* (mycobactérie à croissance rapide décrite en 2001) isolée de l'environnement

. 1 souche de *M. colombiense* (mycobactérie proche de *M. avium* décrite en 2006) isolée d'un prélèvement fémoral chez un patient séropositif pour le VIH et considérée responsable d'infection.

. 1 souche de *M. genavense* considérée responsable d'infection.

Au total, 241 (49%) des 492 souches de mycobactéries atypiques ont été considérées comme responsables d'infections.

Identification sur prélèvements

Parmi les 103 prélèvements reçus, 79 ont été mis en culture, les autres étant destinés à des tests moléculaires ou au diagnostic de la lèpre (cf plus loin). 41 cultures étaient négatives, 2 contaminées (2,5%) et 36 positives. Parmi les cultures positives on retrouvait les espèces suivantes : *M. tuberculosis complex* (27), *M. avium complex* (2), *M. xenopi* (2), *M. fortuitum* (1), *M. gordonae* (1), *M. malmoense* (1), *M. marinum* (1), *M. ulcerans* (1) (NB : ce dernier prélèvement provenait d'une malade pour laquelle nous avons aussi reçu des souches de *M. ulcerans*, cf ci-dessus).



Pour 52 de ces 103 prélèvements (50%) nous avons recherché l'ADN de *M. tuberculosis complex* par PCR Amplicor®.

Pour 15 des 19 prélèvements à examen microscopique positif, la PCR a été positive (79%). Pour 2 prélèvements la PCR était inhibée, pour le premier la culture a en fait été positive à *M. xenopi* et pour le 2^{ème} l'amplification-séquençage du gène *rpoB* a permis l'identification de *M. xenopi*. Pour 2 prélèvements la PCR était négative (1 culture négative et 1 culture positive à *M. malmoense*).

Pour 5 des 16 prélèvements pour lesquels l'examen microscopique était négatif la PCR a été positive (31%) et pour 7 la PCR a été négative. Pour 4 prélèvements la PCR était inhibée : pour 3 la culture était positive à *M. avium complex* (n=1) et *M. tuberculosis complex* (n=2), ces 2 derniers cas étant de faux négatifs de la technique PCR Amplicor (dans l'un des deux, l'approche par PCR du gène *rpoB* a été positive).

Enfin, pour 17 prélèvements, l'examen microscopique n'a pas pu être fait en raison d'un trop faible volume. La PCR a été positive pour 8 patients, négative pour 8 autres et inhibée pour le dernier.

Souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux

442 souches ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques : 215 bacilles de la tuberculose et 227 mycobactéries atypiques.

1. Bacilles de la tuberculose

Les tests de sensibilité sur les 215 souches de *M. tuberculosis complex* reçues au CNR ont été :

- un antibiogramme standard (antituberculeux de première ligne) pour 95 souches
- un contrôle de sensibilité à un antibiotique isolé pour 30 souches
- un antibiogramme « complet », (antituberculeux de première ligne et antibiotiques de 2^{ème} ligne) pour 90 (42%) souches dont 51 souches envoyées pour multirésistance, 22 souches envoyées pour résistance à au moins l'isoniazide ou la rifampicine et 17 envoyées pour suspicion de résistance ou parce que les patients présentaient des intolérances médicamenteuses.

Résistance aux antibiotiques de 1^{ère} ligne (185 souches testées) :

- 47% étaient sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine.
- 53% étaient résistantes à au moins un de ces 4 antibiotiques :
 - . 25% résistantes à au moins un de ces 4 antibiotiques, mais non multirésistantes
 - . 28% multirésistantes (MDR) c'est-à-dire résistantes à isoniazide et rifampicine (n=51)

Remarques : Parmi les 80 souches présentant une résistance à au moins un antituberculeux de première ligne et pour lesquelles les antécédents de traitement étaient connus, le taux de résistance primaire était de 66%. Ce chiffre est beaucoup plus élevé 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 (90 souches testées):

Résultats pour les souches envoyées pour multirésistance (n=51) :

Les proportions de souches résistantes étaient : streptomycine 3/4, éthambutol 1/3, éthionamide 1/2, cyclosérine 1/3, PAS 6%, au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 16%, fluoroquinolones 14%. La proportion de souches résistantes aux fluoroquinolones et à au moins un aminoside de réserve (définition de l'ultrarésistance ou **XDR**) était de **4% (2 cas de tuberculose XDR)**.

Le nombre de souches **MDR** reçues au CNR, qui avait augmenté de 2001 (n=29) à 2003 (n=60) puis était resté stable en 2004 (n=51) et 2005 (n=60) a un peu diminué en 2006 (n=53) puis 2007 (n=38). En 2008 le nombre de souches MDR reçues est de 51 ce qui correspond à la moyenne des années 2001-2007, soit environ une souche par semaine.

Le nombre de souches **XDR** reçues au CNR est resté de 1 ou 2 par an ces dernières années. On note une petite tendance à l'augmentation de la proportion de XDR au sein des souches MDR : 4% en 2006, 5% en 2007 et 4% en 2008 (2% jusqu'en 2005).

Résultats pour les souches « hors multirésistance » (n=39)



La résistance aux antituberculeux de 2^{ème} ligne était plus rare parmi ces souches que parmi les souches multirésistantes : 5% aux aminosides de réserve, 5% aux fluoroquinolones, 8% à l'éthambutol, 25% à l'éthionamide et 6% à la cyclosérine.

Les deux souches résistantes aux fluoroquinolones provenaient 1) d'une patiente connue pour être infectée par une souche monorésistante à la rifampicine et chez qui la sélection de la résistance aux fluoroquinolones a été la conséquence d'un traitement mal conduit et 2) d'un patient infecté par une souche résistante à l'isoniazide et pour laquelle des mutants résistants à la rifampicine ont été retrouvés ($<1/10^5$) sans toutefois atteindre le seuil critique de 1% permettant de la déclarer résistante, donc multirésistante.

2. Mycobactéries atypiques

M. avium complex: parmi les 148 souches reçues, 71 ont fait l'objet d'un antibiogramme dont 4 (6%) étaient résistantes à la clarithromycine (CMI >8 mg/l). Ces 4 souches provenaient de malades ayant déjà reçu des macrolides (résistance secondaire) dont 2 étaient déjà connus du CNR.

Le taux de résistance secondaire à la clarithromycine, parmi les 20 malades infectés par *M. avium complex* ayant des antécédents de traitement par macrolides, était de 20%. Ce chiffre est stable par rapport à 2006 et 2007 et cohérent avec les résultats des rares enquêtes systématiques effectuées jusqu'ici.

M. xenopi: Parmi 66 souches reçues, 42 ont fait l'objet d'un antibiogramme dont 1 était résistante à la clarithromycine et provenait d'un malade traité depuis plusieurs années pour xenopiose et déjà connu porteur d'une souche résistante aux macrolides (ce cas de résistance représentait 12% des malades infectés par *M. xenopi* ayant des antécédents de traitement).

M. kansasii: Parmi les 21 souches reçues, 15 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante y compris parmi les 3 malades ayant des antécédents de traitement.

Espèces à croissance rapide: 4 des 19 souches de *M. abscessus* testées et 2 des 8 souches de *M. massiliense* testées étaient résistantes à la clarithromycine. En revanche, aucune des 9 souches de *M. chelonae* et des 2 souches de *M. bolletii* testées, n'était résistante à la clarithromycine,

3. *M. leprae*

Nous avons reçu en 2008 18 biopsies pour diagnostic de lèpre dont 7 étaient positives à l'examen microscopique. Cinq étaient des nouveaux cas dont 4 de Nouvelle-Calédonie et 1 du Sri Lanka et, deux étaient des cas connus dont 1 contrôle sous traitement et 1 une rechute (Nouvelle-Calédonie) et pour lesquels les résultats de l'antibiogramme ne sont pas encore disponibles.

Sur la base des tests génétiques (amplification-séquençage des gènes *rpoB* et *folP*), 4 souches ont été considérées comme sensibles à la rifampicine et aux sulfones et 1 résistante aux sulfones (mutation T531 dans *folP*). Les amplifications étaient négatives pour le dernier cas.

En 2008 nous avons eu le résultat d'un antibiogramme in vivo fait en 2007 pour un patient de la Martinique en rechute après un traitement par rifampicine, ofloxacine, minocycline et sulfones. La souche est sensible in vivo à la rifampicine. La souche n'avait pas de mutation dans *rpoB* ni *folP* ni *gyrA* ni *gyrB*.

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

Matériel: 276 souches et prélèvements ont été soumis à la détection moléculaire rapide de la résistance à la rifampicine et l'isoniazide (a) parce que provenant de malades déjà traités pour tuberculose et/ou immunodéprimés et/ou provenant d'un pays de forte endémie de résistance ou (b) pour contrôle de résistance à la rifampicine ou à l'isoniazide.

Résultats

Rifampicine (RIF):

Le système d'amplification-sonde MTBR_{plus} a permis d'identifier des mutations dans *rpoB* pour 58 souches:

- 34 mutations S531L (58%)
- 7 mutations H526Y ou H526D (14%)
- 3 mutations D516V (5%)



- Pour 14 souches la bandelette MTBDR_{plus} ne permettait pas d'identifier précisément les mutations. Le séquençage du gène *rhoB* a permis de préciser la mutation, qui était le plus souvent en position 526 (n=5) et 533 (n=2). De façon intéressante la mutation L533P trouvée dans 2 souches était associée à un bas niveau de résistance faisant classer la souche alternativement comme sensible ou comme résistante.

Isoniazide (INH)

- 67 mutations en 315 dans *katG* (77%). Ces mutations sont toujours corrélées avec la résistance à INH à haut niveau par antibiogramme phénotypique.
 - 29 mutations dans la région régulatrice du gène *inhA* (33%). Ces mutations sont corrélées avec une résistance à INH à bas niveau par antibiogramme phénotypique
- Il faut noter que 12 souches (14%) avaient une mutation du gène *inhA* et une mutation du gène *katG* et, plus précisément, que cette association était présente chez :
- 18% des souches avec une mutation dans *katG*
 - 41% des souches avec une mutation dans *inhA* (chez ¼ de celles avec une mutation en -15 mais chez toutes celles avec une mutation autre que -15).

Pour 14 autres souches ayant des niveaux de résistance variable à l'isoniazide, le test MTBDR_{plus} n'a pas mis en évidence de mutations, soit 14% des souches résistantes à l'isoniazide. Ces souches ont été soumises à un séquençage complet des gènes *katG* et *inhA* :

- 4 souches résistantes à 0,1 mg/l (ce qui en clinique correspond à une souche encore déclarée sensible) : mutations S94A dans *InhA*, -102G>A dans le promoteur d'*InhA*, et T344P et D189G dans *KatG*.
- 1 souche de bas niveau de résistance à l'INH (0,2 mg/l) : mutation W90C dans *KatG*.
- 5 souches résistantes à 1 mg/l (haut niveau de résistance) : mutations pour 4 souches, *KatG* : A110V, Q439P et Q439R, S315N et T271P, G285V et S460N, pas de mutation *KatG* ni *InhA* pour 1 souche.
- 4 souches de très haut niveau de résistance à l'INH (10 mg/l) : mutation pour les 4 souches dans *KatG* : H270R, A162E, L453P, délétion en 371.

Au total la bandelette MTBDR_{plus} permet de détecter environ 85% des mutations associées à la résistance à l'isoniazide, comme nous l'avons montré les années précédentes (Brossier F et al. Int J Tuberc Lung Dis. 2009 Feb;13(2):260-5, Brossier F et al. J Clin Microbiol. 2006 Oct;44(10):3659-64).

Le séquençage complet des gènes *katG* et *inhA* permet de porter quasiment à 100% le taux de détection moléculaire des souches résistantes à l'isoniazide, au prix, il est vrai, d'un gros travail supplémentaire.

Multirésistance

L'utilisation du kit Genotype MTBDR_{plus}® et des séquençages vus ci-dessus a permis de détecter ou de confirmer rapidement, avant les résultats de l'antibiogramme phénotypique, la multirésistance de la totalité des 51 souches MDR reçues en 2008.

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 172 souches, c.a.d. les 51 souches MDR et d'autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux.

En raison de l'arrêt de fabrication des tubes acides « bouchés coton » par la société Biorad, le test phénotypique n'a pas pu être fait et l'interprétation de l'impact de la mutation sur la résistance s'est faite à l'aide des données de la littérature et de la modélisation de la pyrazinamidase.

Parmi 172 souches, 42 avaient une mutation du gène *pncA* dont 5 *M. bovis* (résistance naturelle par « mutation » H57D).

Fluoroquinolones (FQ)

Le séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour l'ADN gyrase, cible des fluoroquinolones, a été effectué pour 150 souches c.a.d pour les 51 souches multirésistantes et pour d'autres souches suspectes (ex : rechutes) :

- mutation dans *gyrA* chez 11 souches, toutes MDR.

9 avaient des mutations connues pour entraîner la résistance aux fluoroquinolones (A83V, D87A, G ou H), ce qui a été confirmé ultérieurement par l'antibiogramme. Deux avaient une mutation (T73 A)



que nos travaux précédents (Aubry, AAC 2006) avaient montré ne pas être associée à la résistance aux fluoroquinolones. Ces 2 souches, MDR, étaient bien sensibles aux fluoroquinolones par antibiogramme phénotypique. Cette mutation semble être une caractéristique des souches du Congo.

- pas de mutation pour les autres souches dont la sensibilité aux fluoroquinolones a été confirmée par l'antibiogramme phénotypique.
- mutations dans *gyrB* chez 2 souches, une résistante aux fluoroquinolones (D426A) et l'autre non (P404A), correspondant vraisemblablement à un polymorphisme.

Résultats des tests effectués directement sur des prélèvements

Parmi les résultats globaux, une partie concerne 27 prélèvements soumis à une détection moléculaire rapide de la résistance à RIF par hybridation sur bandelette Genotype MTBDR*plus* suivie, en cas d'échec par une PCR nichée et séquençage de *rpoB*.

En raison de l'intérêt des tests directs faits sur les prélèvements, nous en exposons ci-dessous les résultats :

- parmi les 13 prélèvements positifs à l'examen microscopique, le test MTBDR*plus* a donné un diagnostic de sensibilité dans 2 cas, était ininterprétable dans 1 cas (pour lequel la PCR nichée de *rpoB* a donné un diagnostic de sensibilité) et n'a pas permis d'amplification dans 8 cas, 6 pour lesquels la PCR nichée de *rpoB* a donné un diagnostic de sensibilité dans 3 cas et de résistance dans 1 cas alors qu'elle n'a pas permis l'amplification pour les deux derniers.
- parmi les 5 prélèvements négatifs à l'examen microscopique, le test MTBDR*plus* a donné un diagnostic de sensibilité dans 4 cas et n'a pas permis d'amplification pour le dernier cas, pour lequel la PCR nichée de *rpoB* a donné un diagnostic de sensibilité.
- parmi les 9 prélèvements pour lesquels l'examen microscopique n'a pu être fait en raison du volume trop faible, le test MTBDR*plus* a donné un diagnostic dans 5 cas (2 sensibles et 3 résistants) et n'a pas permis d'amplification dans 4 cas, dont 3 pour lesquels la PCR nichée de *rpoB* a donné un diagnostic dans 1 cas (sensible) mais n'a pas permis d'amplification pour les deux autres cas.

Au total, le diagnostic de la sensibilité à la rifampicine directement sur prélèvement a été possible grâce aux techniques moléculaires dans 18 cas sur 27 (67%) dont 11 (41%) grâce au test MTBDR*plus* seul et 7 (26%) grâce à la PCR nichée du gène *rpoB* faite en complément.

Expertise en santé animale

Nous n'avons pas reçu de prélèvements animaux en 2008. Ceci est lié à l'augmentation de l'expertise en mycobactériologie du laboratoire de l'AFSA, grâce à la venue de Mme Laura Boschiroli avec qui nous développons des échanges de formations (étudiants, techniques).

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 antibiotiques est réalisée à partir de 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 Jeanne 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 clinique 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 puis analysées.

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, avec l'aide d'environ 300 laboratoires correspondants (Réseau CNR-MyRMA), la surveillance annuelle du nombre de malades ayant une tuberculose bactériologiquement confirmée (culture positive) et, parmi ces malades, du nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine (cas de tuberculose à bacilles multirésistants ou MDR).

Estimation de la couverture des réseaux ou représentativité, évolution

Evolution du réseau Azay-Mycobactéries

Le nombre de CHU participant au réseau Azay-Mycobactéries a doublé depuis 1995 : 15 en 1995, 23 en 2001, 27 en 2002, 33 en 2004 et 32 en 2006 et 34 en 2007. Un CHU de la région PACA n'a plus la capacité de fournir l'ensemble des données de surveillance depuis 2006 et ses données ne sont donc plus incluses dans celles du réseau. Cette région qui était représentée au sein du réseau par 2 CHU est maintenant représentée par un seul CHU. En revanche, la région Auvergne est maintenant représentée depuis que le CHU de Clermont-Ferrand a intégré le réseau en 2008, en fournissant les données pour les malades diagnostiqués en 2007. Pour rappel, l'Alsace qui était l'avant dernière région à intégrer le réseau, adresse les données depuis 2006 pour les malades diagnostiqués depuis 2005.

Au total, le réseau Azay-Mycobactéries a couvert en 2008, pour les données 2007, 21 des 22 régions métropolitaines françaises. La Corse ne comporte pas de CHU et ne peut donc être directement représentée dans le réseau Azay-Mycobactéries des laboratoires de CHU.

La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis qui ont montré que la sensibilité du réseau est bonne (>95%), que la concordance des données avec celles de la DO et celles des dossiers des médicaux des cas est bonne et, que les discordances observées ont un impact très faible sur les taux de résistance stratifiés par facteur de risque (antécédents de traitement, pays de naissance). En effet, après corrections tenant compte de ces discordances, les taux corrigés contiennent tous les taux observés par le réseau (cf rapport 2006 et 2007 et Guérin-Tran, Eur J Epidemiol 2006, BEH 2006, et Khuê, Epidemiol Infect 2008).

Analyse des caractéristiques du réseau CNR-MyRMA

L'analyse des cas bactériologiquement documentés en 2007 par les 261 laboratoires répondants montre que la distribution du nombre des cas est très hétérogène : extrêmes = 0-279 cas, 1^{er} décile : 39 cas, 1^{er} quartile : 16 cas, médiane : 5 cas, 3^{ème} quartile : 1 cas, 9^{ème} décile : 0 cas. Ces chiffres sont légèrement inférieurs à ceux de l'année 2005 (1^{er} décile : 43 cas, 1^{er} quartile : 18 cas, médiane : 7 cas, 3^{ème} quartile : 2 cas). La région Ile-de-France a diagnostiqué 49,5% des cas documentés de l'année 2007 (14,6% du total des cas à Paris) mais 64% des cas MDR (24% des cas à Paris). La deuxième région a été Rhône-Alpes : 11,9% du total des cas et 11% des cas MDR.

Comme les années précédentes, la moitié des cas de tuberculose diagnostiqués en 2007 était concentrée dans les 25 laboratoires dont l'activité est la plus importante :

- 14 laboratoires de CHU dont 9 de l'APHP (6 de Paris intra-muros, 3 de la petite couronne) et 5 de province
- 6 hôpitaux généraux d'Ile-de-France, 1 de province et 1 de Cayenne
- 3 gros laboratoires privés

Les 25 laboratoires ci-dessus ont identifié près de la moitié (47%) des cas MDR de l'année.

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 méningite tuberculeuse chez les enfants de moins de 5 ans, il a été décidé d'identifier chaque année le nombre de ces cas qui constitue 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, le CNR-MyRMA a entrepris une enquête rétrospective concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants de < 5 ans à travers le réseau des 300 laboratoires (cf chapitre 7). Le recueil d'information auprès des cliniciens et des laboratoires est encore en cours. Les données seront croisées au cours de l'année 2009 avec celles disponibles à l'InVS et recueillies dans le cadre de la Déclaration Obligatoire.

Par ailleurs, l'enquête, qui a lieu habituellement tous les 5 ans sur la méningite tuberculeuse à culture positive tous ages confondus a été entreprise en 2008 sur les cas diagnostiqués en 2006 et en 2007.

Cette enquête permettra

- a) d'analyser les tendances évolutives des caractéristiques des cas depuis 1990,
- b) de croiser les données du CNR avec les données de l'InVS (DO) pour les années 2006-2007 afin de corriger l'incidence mesurée par les deux sources et
- c) d'extraire les données sur les méningites chez les enfants de < 5 ans, ce qui complètera les données 2001-2005 (cf ci dessus) par les données 2006-2007, c'est-à-dire les deux années au moment du changement de politique vaccinale.

3.2. Surveillance de la résistance aux anti-infectieux

La surveillance menée par le CNR-MyRMA a porté en 2008, 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).

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 2008 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2007 par 34 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries. Au total, le réseau a inclus 1549 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2007. Un antibiogramme a été réalisé pour 1526 de ces 1549 cas. Le nombre de cas inclus en 2007 est un peu supérieur à celui des cas inclus en 2006 (n=1507).

L'Île de France représente 46% des 1549 cas recensés par le réseau en 2007. La région Rhône-Alpes a recensé 9% des cas, l'Aquitaine 7,5% et la région Midi-Pyrénées 5,9% des cas. Six régions ont recensé chacune de 2 à 5% des cas alors que les 11 régions en ont recensé chacune moins de 2%.

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

Au cours de l'année 2008, le CNR-MyRMA a entrepris le recueil des données concernant l'année 2007. Comme chaque année, les données sont encore incomplètes au moment de rédiger le rapport d'activité.

Parmi les 295 laboratoires appartenant au réseau CNR-MDR en 2005, 252 (86%) et 261 (89%) avaient répondu respectivement en 2006 et 2007. Le nombre de laboratoires ayant arrêté leur activité de mycobactériologie, pour les transférer à un autre laboratoire appartenant au réseau CNR-MDR était de 3 en 2006 et de 6 en 2007. Parmi les 32 laboratoires non répondants de 2007, 22 n'avaient pas non plus répondu en 2006 et les 10 autres avaient diagnostiqué en 2006 un total de 124 cas, soit moins de



3% du total des cas colligés chaque année par le réseau. Ces données manquantes ne faussent probablement pas les résultats observés.

Définitions utilisées pour exprimer la résistance

La surveillance a porté sur la résistance aux antituberculeux de 1^{ère} ligne (streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol) des souches 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).

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 1255 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 **10,0%**.

Le taux de résistance primaire à chacun des antituberculeux était beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (**INH 6,5%**) et la streptomycine (SM, 6,4%) que pour la rifampicine (**RMP 1,0%**) et l'éthambutol (EMB, 0,2%). La totalité des 12 souches résistantes à RMP étaient aussi résistantes à INH. La proportion de cas **multirésistants « primaires »** était donc de **1,0%**. Ces chiffres sont légèrement inférieurs à ceux de l'année 2006 (1,4%).

Résistance primaire et pays de naissance

Le taux de résistance primaire à au moins un antituberculeux chez les 491 malades nés en France était de 7,1% alors qu'il était de 11,9% chez les 724 nés à l'étranger ($p < 0,01$). Les taux de résistance étaient plus élevés chez les malades nés à l'étranger que chez ceux nés en France, pour INH (7,5% vs 4,9% ; $p = 0,07$) et RMP (1,2% vs 0,6% ; $p = 0,38$) mais cette différence était statistiquement significative uniquement pour SM (7,9% vs 4,6% ; $p = 0,03$).

Finalement, 9 des 12 (3/4) souches multirésistantes « primaires » concernaient 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 2007 chez les nouveaux cas de tuberculose.

Taux global de résistance « secondaire »

Chez les 102 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 15,7%, soit 1,5 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas. Ce taux est un peu inférieur à celui observé en 2006 (18,0%) et 2005 (21,4%). Comme en 2006, le taux de résistance "secondaire" à INH (12,8%) est légèrement supérieur à celui observé pour SM (9,1%). Le taux de résistance secondaire à RMP (8,8%) était près de 10 fois plus élevé que le taux de résistance primaire à cet antibiotique (1,0%). La quasi totalité des souches résistantes à la rifampicine (7/9) étaient multirésistantes. La proportion de cas **multirésistants « secondaires »** était de **6,9%**, soit 7 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 11,1% chez les 36 malades nés en France alors qu'il était de 18,8% chez les 64 malades nés à l'étranger ($p = 0,40$). Le taux de résistance était plus élevé chez les malades nés à l'étranger pour chaque antituberculeux mais, les différences n'étaient pas statistiquement significatives. Les 7 cas de multirésistance secondaire concernaient des malades nés à l'étranger dont 6 étaient séronégatifs pour le VIH.

Monorésistance secondaire à la rifampicine



Il y avait 2 cas (2,0%) de "mono-résistance" secondaire à RMP. Comme pour les cas identifiés en 2005 et 2006, les malades étaient co-infectés par le VIH, l'un né en France et l'autre à l'étranger.

2. Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants

Les données disponibles à ce jour pour les cas diagnostiqués en 2007 concernent 4691 cas de tuberculose bactériologiquement prouvés, soit 93% de l'effectif de 2005 et 97% de celui de 2006.

Le nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2007 par les 261 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour est de 45, soit 0,96% des 4691 cas enregistrés. Ce pourcentage est un peu inférieur à ceux des années 2003-2005 (1,3 à 1,4%) et à celui de 2006 (1,2%). Parmi les 45 cas MDR diagnostiqués en 2007, 5 (11%) étaient déjà connus les années précédentes. Cette proportion de cas chroniques est dans la fourchette de celles observées au cours des 5 dernières années (9 à 16%).

Les caractéristiques des 40 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2007 sont les suivantes :

- 56% sont des hommes
- 4 (10%) sont nés en France et 35 (88%) à l'étranger (un cas de pays de naissance inconnu),
- parmi les 35 cas nés à l'étranger, 13 sont nés en Afrique sub-saharienne, 3 au Maghreb, 10 en Europe (dont 8 en Europe de l'Est), 5 en Asie, 1 aux USA et 1 en Amérique du Sud,
- l'âge médian est 30 ans (30% de 10 à 24 ans et 40% de 25 à 34 ans),
- 7,5% sont séropositifs pour le VIH, 87,5% sont séronégatifs et 5% de statut VIH inconnu
- 90% des cas ont une tuberculose pulmonaire
- 45% ont un examen microscopique positif (c.a.d. sont très contagieux)
- 68% n'ont jamais été traités (MDR « primaire »)
- le diagnostic bactériologique a été fait pour 60% des cas dans un laboratoire d'Ile-de-France
- 60% 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 ») sont confirmées pour 2007.

3. Analyse des tendances en matière de résistance aux antituberculeux

Les taux de résistance « primaire » aux antituberculeux majeurs (isoniazide et rifampicine) étaient en 2007 très proches de ceux de 2006, ce qui justifie de maintenir en France les recommandations thérapeutiques de l'OMS pour les nouveaux cas.

Les taux de résistance « secondaire » aux mêmes antituberculeux étaient en 2007 en légère diminution par rapport aux taux de 2005 et 2006.

La légère diminution du phénomène de multirésistance observé en 2006 est confirmée en 2007 avec un retour de la proportion annuelle de cas multirésistants inférieure à 1% comme au cours des années 1990. Il est peu probable que le nombre de cas multirésistant augmente avec les réponses des laboratoires retardataires car tous les cas correspondant aux souches adressées au laboratoire du CNR-MyRMA pour confirmation et antibiogramme complémentaire ont été inclus dans l'analyse en 2007. En revanche, la proportion de MDR pourrait être légèrement inférieure après intégration au dénominateur (total des cas de tuberculose à culture positive) des données des laboratoires retardataires qui ne concerneront très probablement que des cas de tuberculose non MDR.

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

En 2008, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser le **génotypage** moléculaire (empreintes digitales génomiques) de 172 souches de *M. tuberculosis* et 11 souches de *M. chelonae* (cf section 4).

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
- 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 MIRU-VNTR 24 loci a été appliquée aux souches MDR depuis octobre 2008.

Résultats

Complément d'enquêtes épidémiologiques « autour d'un cas » (91 souches)

24 suspicions de transmission en collectivité (65 souches) :

Le typage a permis de confirmer la transmission dans 16 cas comportant de deux à dix souches de même génotype :

- 4 fois au sein de familles (1 cas secondaire dans les 4 cas)
- 3 fois au sein d'une université (2 cas secondaires dans 1 cas et 1 cas secondaire dans les 2 autres cas)
- 2 fois au sein d'une entreprise (2 cas secondaires dans 1 cas et 1 cas secondaire rattaché à une épidémie de tuberculose survenue dans une entreprise en 2007)
- 1 fois au sein d'une maison de retraite (1 cas secondaire)
- 1 fois au sein d'un foyer d'hébergement pour personnes précaires (9 cas secondaires)
- 5 fois dans la communauté (3 cas secondaires dans 1 cas, 2 cas secondaires dans 1 autre cas et 1 cas secondaire dans les 3 autres cas)

7 suspicions de transmission nosocomiale (21 souches) :

- 4 suspicions de transmission de malade à malade : 3 suspicions ont été infirmées par le typage. Une suspicion concernant un CHU de l'AP-HP a été confirmée, montrant le lien entre 7 cas (1 cas index et 6 cas secondaires dont 1 soignant) (cf Alertes).
- 3 suspicions de transmission de malade à soignant (2 souches correspondant à 2 cas pour chaque suspicion) : le typage a confirmé la transmission pour les 3 cas de suspicion.
- 3 suspicions de rechute (2 souches pour chacune des suspicions : souche initiale et souche « rechute ») : le typage a confirmé la rechute (même souche que la souche initiale) pour les 3 suspicions. Dans un cas, il y avait eu sélection d'une résistance à l'isoniazide et, dans un autre cas il y avait eu une rechute méningée à partir d'une souche d'origine pulmonaire.

Programme MDR Euro-TB (48 souches)

Le résultat de l'analyse MIRU est disponible pour 48 des 51 souches MDR reçues en 2008. Les codes MIRU générés ont été analysés à l'aide de l'application web « **MIRU-VNTR^{plus}** » ce qui a permis de déterminer que 36 des 48 souches MDR isolées en 2008 peuvent être rattachées à 7 lignées différentes : familles Beijing (n=14), URAL (n=2), Cameroon (n=3), S (Euro-American) (n=3), Ghana (n=5), Haarlem (n=2) et LAM (n=3). Les 16 autres souches ne peuvent pas être rattachées à une lignée définie.

L'analyse des 48 souches par « minimum spanning tree » indique l'existence de 4 groupes de souches présentant des MIRU proches, voir identiques. Le groupe le plus important (n=12) correspond à des souches de la lignée Beijing. Cinq des 12 souches présentent un code MIRU identique (groupe CC1). Le deuxième groupe (groupe CC2, n=5), relié à la famille Ghana, inclut 2 souches à code MIRU



identique. Dans chacun des deux autres groupes minoritaires CC3 (n=2) et CC4 (n=2), aucune souche ne présentait un code MIRU strictement identique.

L'analyse du dendrogramme MIRU confirme l'existence de 2 souches à MIRU identiques respectivement dans les familles Beijing (5 cas) et Ghana (2 cas) et l'existence d'un troisième cluster de deux souches parmi les 16 qui ne sont pas rattachées à une lignée définie.

Parmi les 3 clusters de souches à MIRU identiques :

Groupe 1 (2 souches de lignée non définie) : correspond à deux malades ayant eu des contacts démontrés et pour lesquelles les souches présentaient les mêmes mutations conférant la résistance aux antituberculeux. La transmission entre ces deux malades est donc confirmée par le génotypage.

Groupe 2 (2 souches de lignée Ghana) : deux malades originaires l'un du Congo (arrivé en France 3 mois avant le diagnostic de tuberculose) et l'autre de Côte d'Ivoire pour lesquels aucun contact n'a été retrouvé. Les deux souches présentent des mutations différentes conférant la résistance aux antituberculeux dans 3 gènes : *rpoB*, *inhA* et *pncA*. Malgré le même profil MIRU la transmission n'a donc pas été retenue entre ces deux patients.

Groupe 3 (5 souches de lignée Beijing) : cinq malades originaires pour deux de Tchétchénie, deux d'Arménie et un d'Algérie. Ces patients étaient pris en charge dans cinq villes françaises différentes, aucun contact entre eux n'a été retrouvé. Seules deux de ces cinq souches présentaient le même profil de mutations dans les gènes de résistance aux antituberculeux mais, ces deux mutations se trouvent être les plus fréquentes et ne sont donc pas discriminantes. Ces deux souches proviennent des deux malades originaires d'Arménie dont l'une est arrivée en France en 2008 pour se faire traiter et a été prise en charge en France dès son arrivée. Malgré le même profil MIRU, il est donc exclu que la transmission se soit produite en France mais il est possible qu'elle se soit produite dans le pays d'origine.

N.B. : Il apparaît que l'analyse MIRU n'est pas très discriminante pour les souches Beijing, ce qui a déjà été rapporté dans la littérature.

Au total, la transmission directe entre les patients n'a été confirmée que dans un seul des 3 groupes. La proportion est la même qu'en 2007 où la transmission directe n'avait été établie que pour 1 seul cluster.

La répartition des souches MDR 2008 sur une carte géographique selon le pays d'origine des patients montre une prédominance des souches appartenant aux lignées Ghana et Cameroon pour les patients originaires d'Afrique et de celles appartenant à la lignée Beijing pour les souches des patients originaires d'Europe de l'est et d'Asie. Concernant les patients originaires de France, on note une grande diversité des lignées.

Nous avons entrepris en 2008 de déterminer rétrospectivement le code MIRU-VNTR des souches MDR isolées en 2006 et 2007, pour lesquelles nous disposons également de l'empreinte digitale génomique RFLP. Nous avons à ce jour déterminé les codes MIRU de 68 souches et, les résultats sont en cours d'analyse. Ils permettront plus particulièrement de comparer les performances de l'approche MIRU-VNTR à celles de l'analyse RFLP pour l'identification des souches MDR françaises les plus suspectes de transmission croisée.

Suspicion de contamination de laboratoire (28 souches)

Nous avons reçu des souches correspondant à 11 suspicions de contamination de laboratoire. Pour 8 de ces 11 épisodes, le typage a confirmé la contamination de laboratoire (souches non distinguables). Ces 8 épisodes totalisaient 17 souches, par groupes de 2 souches (7 groupes) ou de 3 souches (1 groupe).

Surveillance de la transmission de tuberculose dans les foyers parisiens (5 souches)

En collaboration avec la Direction de l'Action Sanitaire et de l'Enfance de la ville de Paris (DASES), une étude 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 résultats pour les années 1998 à 2007 ont été présentés dans les précédents rapports d'activité.

En 2008, le CNR a réalisé le typage de 5 souches de patients ayant fréquenté le foyer Claude Tillier (plus de 100 cas de tuberculose dans un foyer de travailleurs migrants lors d'une épidémie en 2002 (cf rapports précédents). Sur ces 5 souches, 3 appartenaient au cluster Tillier et 2 étaient différentes.



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

Le CNR comme d'autres laboratoires européens est dans une phase de transition avec le remplacement de la technique de typage de référence RFLP par la technique MIRU-VNTR 24 loci. La transmission des données MIRU-VNTR à une base de données européenne commune reste à mettre en place.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

En 2008, le CNR a participé aux enquêtes suivantes :

- Enquête sur une épidémie de tuberculose nosocomiale dans un CHU de l'AP-HP (Bicêtre)
- Enquête autour d'un cas : d'infection cutanée à *M. chelonae* après carboxythérapie (cf section 4)
- Enquête autour d'un cas : d'infection cutanée à *M. chelonae* après balnéothérapie (cf section 4)

4. Alerte

Tuberculose nosocomiale

Un patient admis en Néphrologie a été trouvé atteint d'une tuberculose pulmonaire très bacillifère 5 jours après son hospitalisation. Cinq patients greffés rénaux hospitalisés en même temps que lui dans le même service (dont son voisin de chambre) et un aide-soignant travaillant dans le service ont déclaré une tuberculose maladie dans les mois suivants. La comparaison, faite au CNR-MyRMA, des souches de *M. tuberculosis* issues des 7 patients (cas « index » et 6 cas « secondaires »), toutes sensibles aux antituberculeux, ainsi que des souches provenant de patients du même service hospitalisés les mois précédents le diagnostic du cas index, a permis de démontrer l'identité des souches des 7 premiers patients, qui étaient en revanche distinctes des souches les plus anciennes. Ces résultats viennent renforcer et préciser les résultats de l'enquête épidémiologique.

Il s'agit de la plus importante épidémie nosocomiale de tuberculose maladie décrite dans les hôpitaux français depuis de nombreuses années.

Infection cutanée nosocomiale à *M. chelonae*

L'expertise du CNR-MyRMA a été demandée dans le cadre de l'investigation d'un cas d'infection nosocomiale à *M. chelonae* signalé par l'Hôpital National de Saint Maurice (94). Il s'agissait d'une infection ostéo-articulaire avec foyers multiples susceptible d'être liée à une contamination hospitalière lors de bains ou à des séances d'hémodialyse. Des échantillons d'eau provenant des différents centres hospitaliers que le malade avait fréquenté durant les derniers mois avant le début de l'infection et de deux services où il avait été hospitalisé, ont été analysés au Laboratoire d'Hygiène de la ville de Paris et dans les laboratoires de Bactériologie des hôpitaux Henri-Mondor et Villeneuve St-Georges. Trois souches de *M. chelonae* isolées de ces échantillons (points d'eau de deux chambres de l'hôpital Henri Mondor et point d'eau de l'hôpital St-Maurice), la souche du malade, 5 souches isolées d'autres malades hospitalisés à Mondor et la souche de l'épidémie de mésothérapie survenue à Paris en 2007 ont été comparées au CNR-MyRMA par électrophorèse en champ pulsé. La souche du malade était différente des 3 souches de l'environnement, des 5 souches d'Henri Mondor et de la souche de l'épidémie de 2007.

L'investigation de ce cas a été menée par la DGS, le CLLIN Paris Nord et l'InVS.

Infection cutanée après carboxythérapie à *M. chelonae*

L'expertise du CNR a été demandée dans le cadre du signalement fait le 19/09/08 à la DDASS 94 par l'hôpital Saint-Camille de Bry-sur-Marne pour un cas d'infection cutanée à *M. chelonae* chez une patiente ayant fréquenté l'institut Sirena (centre d'esthétique à Royat –Puy de Dôme, 63) où elle avait été traitée du 2 au 7 juin 2008 par carboxythérapie (injection sous-cutanée de CO₂ provenant d'eau thermale) pour cellulite.



Le CNR-MyRMA a confirmé le diagnostic bactériologique et participé à l'enquête étiologique en concertation avec la CIRE Auvergne, la DDASS 63 et l'InVS.

Le CNR- MyRMA a assuré les recherches de mycobactéries dans les prélèvements d'eau faits par la DDASS 63 fin septembre 2008 dans l'établissement Sirena de Royat ainsi que dans le centre thermal de Royat qui utilise la même technique de carboxythérapie.

La méthode utilisée a été celle mise au point dans le cadre du projet Aquamyc (cf 2-1). L'application d'une méthode sensible peut expliquer les concentrations élevées de mycobactéries, supérieures à celles publiées habituellement.

La recherche de mycobactéries atypiques a été positive pour :

(a) 5 échantillons d'eau prélevés à des points d'utilisation (douches, baignoires, lavabos) de l'établissement Sirena. Les concentrations de mycobactéries étaient comprises entre 600 et 1 000 000 UFC/L. Les mycobactéries isolées ont été identifiées par séquençage des gènes *rpoB* et *hsp*.

M. chelonae a été trouvé dans 3 des 5 échantillons. Les concentrations de *M. chelonae* estimées dans les 3 échantillons étaient de 2500, 50 000 et 1 000 000 UFC/L .

(b) 3 sur 7 échantillons d'eau du réseau de l'établissement thermal de Royat. Les concentrations de mycobactéries étaient respectivement de 50, 300, 400 et 90 000 UFC/L. *M. chelonae* a été retrouvé dans un seul point à la concentration de 90 000 UFC/L. Le prélèvement du réseau d'eau potable de cet établissement thermal était aussi très positif pour *M. chelonae* (390 000 UFC/L).

La présence de *M. chelonae* en grande quantité dans l'eau de l'établissement Sirena fréquenté par la patiente infectée a orienté l'enquête sur les risques de contamination par le réseau d'eau lors d'injections ou autres soins (dermabrasion, douches, bains..).

La souche de *M. chelonae* isolée de la patiente (cas index) et les souches de *M. chelonae* isolées de l'eau ont été comparées au CNR-MyRMA (électrophorèse en champ pulsé). La souche isolée chez la patiente avait un pulsotype différent des souches isolées des prélèvements d'eau. Cependant il faut remarquer que (a) les prélèvements ont été faits plus de 3 mois après l'éventuel contage (b) la diversité des souches de *M. chelonae* obtenues en culture est difficile à mettre en évidence car la morphologie des colonies est identique pour tous les clones et (c) la biodiversité (présence simultanée dans l'eau de plusieurs clones) de *M. chelonae* est inconnue.

L'enquête menée par la DASS et la CIRE 63 a permis de recenser 8 autres cas d'infection cutanée chez des personnes ayant fréquenté le même établissement durant la même période. Malheureusement, seuls 3 de ces 8 cas ont fait l'objet de prélèvements bactériologiques et toutes les cultures ont été négatives.

Ces alertes encouragent le CNR- MyRMA à poursuivre son étude sur la présence des mycobactéries dans l'eau (cf section 2.1) et justifie le renforcement de la vigilance au cours des pratiques médicales invasives, en particulier celles exposant aux eaux des réseaux de distribution.

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

Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

Enseignements sur la thématique du CNR

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

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

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

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

Master M2 « Microbiologie », Paris 6

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

DIU médecine tropicale – santé internationale



DIU « tuberculose », Université Pierre et Marie Curie, Université Libre de Strasbourg
Marqueurs épidémiologiques et tuberculose – formation destinée aux CLAT, InVS
DES Biologie Médicale, Université de Paris

Formations aux professionnels de santé

Stagiaires 2008 :

- Sophie Akhnak, stagiaire IUT, en stage pendant 2 mois, a travaillé sur l'étude de l'intéine présente dans la sous unité GyrA de l'ADN gyrase de *M. leprae*
- Lisa Maier, stagiaire M1 de l'Université de Tübingen (Allemagne) a travaillé sur l'étude de l'intéine présente dans la sous unité GyrA de l'ADN gyrase de *M. leprae*
- Pham Minh Khue (stagiaire vietnamien), qui a préparé sa thèse d'Université au CNR de 2005 à 2008, a soutenu avec succès son diplôme en janvier 2008. Il a participé à l'analyse des données et à l'évaluation du réseau Azay-Mycobactéries.
- Elisabeth Kanitz (stagiaire autrichienne) pour un stage de fin d'étude de Master of Science de la London School of Hygiene and Tropical Medicine. Celle-ci a participé à la mise à jour de la base de données des cas de tuberculose à bacilles multirésistants et à l'analyse des cas de tuberculose à bacilles ultra-résistants.
- Aurélie Bonsens de l'Institut de Formation des Techniciens en Analyses Biologiques (IFTAB), en stage pendant 3 mois pour formation à l'épidémiologie moléculaire par la technique de MIRU-VNTR et identification des mycobactéries et détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide par les bandelettes d'hybridation MTBDR et CM-AS HAIN.

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

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. 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
- le rapport 2007 du CNR

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

Conseils thérapeutiques pour la prise en charge des tuberculoses à bacilles multirésistants

Sur les 51 patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants, 2 ont quitté la France avant d'avoir été pris en charge et 44 ont fait l'objet d'un conseil thérapeutique par le CNR.

Parmi ces 44 patients, 22 ont fait l'objet d'une discussion au sein du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes ».



Nicolas Veziris, pneumologue et bactériologiste, avait mis en place en 2003 ce Groupe multidisciplinaire de conseil pour la prise en charge des tuberculoses à traitement difficile (MDR, intolérance médicamenteuse). En 2008, nous avons amélioré le fonctionnement de ce groupe appelé « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes ». Nous avons élaboré le calendrier des réunions pour toute l'année afin de permettre aux membres de pouvoir y participer. Nous rédigeons maintenant un relevé écrit de conseils thérapeutiques qui est envoyé aux cliniciens en charge des patients.

En 2008, les participants aux réunions étaient :

- l'équipe du CNR,
- 3 praticiens du Centre Médical de Bligny (Catherine Gallet, Mathilde Jachym, Nathalie Methivier),
- 1 pédiatre de l'hôpital trousseau (Katarina Chadelat),
- 1 interniste du Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil (Valérie Garrait),
- 1 pneumologue de la Pitié-Salpêtrière (Bertrand Dautzenberg),
- 2 membres de la DASES (Henri-Pierre Mallet puis Arthur Fournier et Sylvie Larnaudie),
- 2 membres du CLAT 94 (Christine Poirier et Gwenaëlle Dacremont).

Six réunions, à un rythme d'une tous les deux mois, ont été organisées en 2008. Un total de 44 dossiers ont été discutés : 22 cas de tuberculose MDR de 2008, 19 dossiers de tuberculose MDR de l'année précédente pour analyser le devenir des malades, ainsi que 3 prises en charge d'infections tuberculeuses latentes autour de 3 cas de tuberculose maladie MDR.

Réception des appels

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 reçus au CNR (5 à 10 par jour) émanent soit de laboratoires correspondants soit de cliniciens prenant en charge des patients ayant des infections à mycobactéries.

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...)

- 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.
- Expertise auprès des autorités sanitaires (DGS, CCLIN) pour des cas d'infection nosocomiale à *M. chelonae*: cf section 4.
- Suivi du Plan national Tuberculose : participation aux travaux des groupes « réduire les disparités » et « BCG » et « Diagnostic »
- Workshop pour la mise en place d'une surveillance de la résistance aux anti-lépreux organisé par l'OMS à Hanoi en octobre 2008 : accréditation du laboratoire du CNR en tant que a) laboratoire correspondant pouvant recevoir des lépromes de malades suspects de résistance en provenance du Mali, d'Ethiopie et du Pakistan et b) laboratoire expert gérant les banques de données de mutations associées à la résistance aux anti-lépreux.

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

Recherches sur les mécanismes de résistance des mycobactéries aux antibiotiques



Etudes des mécanismes de 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 (PncA), son activité enzymatique et la résistance au pyrazinamide, nous avons entrepris de déterminer la structure cristallographique de PncA de *M. tuberculosis*. Après clonage dans un vecteur d'expression pET-29 et expression chez *E.coli*, la protéine PncA de *M. tuberculosis* a été extraite, purifiée par chromatographie liquide et cristallisée (résultats de l'année 2007).

Résultats : En 2008, des cristaux de PncA ont été analysés par diffraction des rayons X, ce qui a permis d'établir la structure 3D de la protéine. Cette structure montre deux différences majeures au niveau du site de fixation du pyrazinamide par rapport aux autres structures apparentées (PncA de *Pyrococcus horikoshii*) : (1) la présence au niveau du site actif d'une poche de fixation pour un ion métallique différent du zinc (Fe ou Mn) et (2) le positionnement spécifique du résidu His57 pour stabiliser cet ion (c'est cette même histidine en position 57 qui est mutée en acide aspartique chez *M.bovis* naturellement résistant au PZA).

L'obtention de la structure de la protéine PncA de *M. tuberculosis* est une avancée majeure pour interpréter des tests génotypiques destinés à prédire la résistance au pyrazinamide. Il sera désormais possible d'évaluer directement dans la structure 3D l'effet des mutations trouvées en routine à partir des isolats cliniques par séquençage du gène *pncA*.

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

Objectif : anticiper et analyser les mécanismes moléculaires de résistance acquise au R207910, un nouvel antibiotique très actif in vitro et in vivo sur les mycobactéries, appartenant à une nouvelle classe d'antibiotiques (les diarylquinolines - DARQ) qui cible l'ATP synthase. En 2006-2007, nous avons déterminé au niveau de l'ATP synthase les régions de la sous-unité C impliquées dans l'interaction avec le R207910 (acides aminés 32, 59, 61, 63 ou 66 localisés au voisinage du résidu catalytique Glu 61 essentiel pour le transfert des protons qui accompagne la synthèse d'ATP). Ces résultats confirmaient que la zone d'interaction de la DARQ avec la sous-unité C est localisée au niveau du site de transport des protons (Glu61) dans l'ATP synthase.

Résultats : En 2008, nous avons poursuivi le travail suivant 2 approches :

(1) *Mise au point d'un système isogénique pour l'analyse des mutations de la sous-unité C.* Afin de comparer les niveaux de résistance conférés par les mutations détectées à ce jour à partir des différentes mycobactéries, nous avons construit chez *M. smegmatis* un système isogénique d'étude de la résistance au R207910. Pour cela, les gènes sauvage et mutés codant pour la sous-unité C de l'ATP synthase (gène *atpE*) ont été clonés dans un vecteur plasmidique pLYG204.zeo qui a été introduit par transformation chez *M. smegmatis* mc2155 (souche sensible au R207910). L'expression des sous-unités C correspondantes dans un contexte isogénique permet une étude comparative des niveaux de résistance associés aux différentes mutations. Les résultats obtenus montrent que l'expression de la sous-unité C portant les mutations D23V, D23G, I66M et E61D est associée à un haut niveau de résistance, avec des CMI variant de 4 à plus de 8 µg/ml. Par contre l'introduction des sous-unités C mutées aux positions 59 et 63 n'a pas permis d'augmenter le niveau de résistance, quel que soit le type de mutation introduite à ces positions, ce qui indique que d'autres mécanismes pourraient intervenir dans la résistance au R207910.

(2) *Etude structurale de la sous-unité C.* Pour permettre de mieux comprendre l'effet des différentes mutations sur l'interaction entre la sous-unité C et la DARQ, nous avons entrepris la construction du modèle tridimensionnel complet de l'anneau constitué par la juxtaposition de 11 sous-unités C tel que présent dans l'ATP synthase de *M. tuberculosis*. Pour cela, nous avons utilisé la structure cristallographique de l'anneau de sous-unité C d'*Ilyobacter tartaricus* pour modéliser celui de *M. tuberculosis*, non seulement à partir de la sous-unité C sauvage, mais également pour chaque mutant. Le mode de fixation de l'antibiotique au niveau de la sous-unité C est en cours d'étude par « docking » à l'aide du logiciel Autodock. La modélisation montre que l'antibiotique vient se placer dans la cavité de fixation du proton au niveau du résidu Glu61. Plus en détail, la modélisation suggère que le brome



porté par le groupement quinoline de la DARQ s'adapte dans une cavité aménagée entre deux sous-unités C. La fixation de l'antibiotique est de plus stabilisée par deux liaisons hydrogènes formées entre la chaîne latérale du Glu61 et les groupements hydroxyle et aminodiméthyle du R207910. La localisation dans le modèle des différents acides aminés impliqués dans la résistance au R207910 montre que chacun de ces résidus participe à la formation de cette cavité. Il est donc clair que la résistance au R207910 dérive de la modification de la poche de fixation de l'antibiotique formée au niveau de l'interface des sous-unités C dans l'ATP synthase.

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

Objectif : Caractériser les souches résistantes à l'isoniazide qui ne présentent pas les 3 principales mutations connues (mutation S315T dans KatG, -15c->t dans le promoteur d'InhA, et S94A dans InhA) et qui présentent une mutation dans KatG en dehors du codon 315. Ce type de mutant représente un dixième des souches de *M. tuberculosis* résistantes à l'INH.

Résultats : Les gènes codant pour la protéine KatG sauvage, le mutant le plus fréquent (S315T) et six nouveaux mutants plus rares A162E, D189G, H270R, Q461P, G494D et F658V ont été étudiés. L'expression dans *Escherichia coli* et la purification des protéines KatG correspondantes ont été obtenues en clonant les différents gènes dans le vecteur d'expression pET30 (permettant l'expression et la purification de protéines marquées par une étiquette His-Tag). Afin de vérifier que l'étiquette His-Tag n'altère pas l'activité de KatG, les gènes *katG* codant pour la protéine sauvage et le mutant de référence S315T ont également été clonés dans le vecteur d'expression pET29 qui permet l'expression des protéines sans étiquette His. A partir de l'ensemble de ces protéines, nous avons entrepris une étude biochimique qui vise à établir le rôle que joue chaque mutation dans la résistance à l'isoniazide. Pour cela, nous avons développé des tests enzymatiques qui permettront d'étudier comparativement les deux activités naturelles de la protéine KatG, catalase et peroxydase. En utilisant une approche spectrophotométrique, nous avons ainsi mis au point la mesure de (a) l'activité catalase par mesure de la dégradation du peroxyde d'hydrogène en présence de l'enzyme KatG à 240nm et (b) l'activité peroxydase par détection à 460nm de la formation d'un composé d'oxydation de la o-dianisidine en présence de t-butyl-hydroperoxyde.

D'autre part, la structure cristallographique de la protéine KatG sauvage de *M. tuberculosis* préalablement déterminée par Zhao X et coll. (code-PDB 2CCA) a été utilisée pour modéliser la position des nouvelles mutations étudiées dans la protéine KatG qui contient un hème lié de façon covalente au niveau d'un site de liaison défini par une poche proximale et une poche distale. Cette analyse montre que la mutation H270R, qui a été identifiée dans une souche clinique de haut niveau de résistance à l'isoniazide, fait partie de la poche proximale et est lié de façon covalente à l'hème. H270R provoque donc la perte de la liaison covalente à l'hème et donc probablement de l'activité catalytique de KatG. La mutation A162E, également trouvée dans une souche de haut niveau de résistance à l'isoniazide, est localisée dans une α -hélice proche de la poche distale et crée un encombrement stérique dans la région de fixation de l'hème. Les autres mutations F658V, Q461P, D189G et G494D trouvées dans des souches montrant généralement un bas niveau de résistance à l'isoniazide, sont localisées dans ces régions éloignées de l'hème et leur rôle dans la protéine KatG paraît moins clair.

Etude du mécanisme de résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*

Objectif : explorer par des outils moléculaires les souches de *M. tuberculosis* MDR pour savoir rapidement si elles sont ou non sensibles aux quinolones. Pour cela nous disposons depuis 2004 d'un outil fiable (ADN gyrase produite par génie génétique) permettant de tester l'implication de nouvelles mutations de l'ADN gyrase dans la résistance aux quinolones.

Résultats

Nous avons identifié une mutation de l'ADN gyrase (S412F en GyrB) non encore décrite, dans une souche MDR. Parce que l'implication de cette mutation dans la résistance est inconnue, nous avons



construit cette mutation de *gyrB* par mutagenèse dirigée et l'avons produite par génie génétique chez *E. coli*. La production de cette enzyme est en cours.

Chimiothérapie expérimentale

Tuberculose

Objectif

L'activité du R207910 a été déterminée dans un modèle d'infection établie où les souris sont infectées par voie intraveineuse avec un large inoculum (6 à 7 log₁₀) et le traitement a été commencé 2 semaines après l'infection afin d'obtenir dans les poumons des souris une population bactérienne proche de celle présente dans les cavernes tuberculeuses de l'homme (7 à 8 log₁₀). Nous avons montré par le passé que (a) le R207910 seul était aussi actif que la quadruple association Amikacine(A) + éthionamide(Et) + pyrazinamide(Z) + Moxifloxacin(M) (AEtZM) et que (b) le R207910 additionné aux antituberculeux de 2^{ème} ligne, 2 mois de traitement permettent de complètement négativer les cultures des poumons et des rates des souris alors que le traitement standard nécessite respectivement 6 et 9 mois pour rendre négatives les cultures des poumons et des rates. Afin d'étudier plus en détail la possibilité d'utiliser le R207910 pour le traitement des tuberculoses à bacilles multirésistants, nous avons étudié l'activité stérilisante du R207910 en association avec les antituberculeux de seconde ligne.

Résultats

Avec le traitement témoin AEtMZ (amikacine, éthionamide, moxifloxacin et pyrazinamide) et malgré une négativation des cultures des poumons après 6 mois de traitement, le taux de rechutes après 3 mois de suivi sans traitement est très élevé (58%). L'adjonction du R207910 à ce régime thérapeutique a permis de réduire le taux de rechutes de 58% à 28%. Deux mois de traitement avec l'association R207910, moxifloxacin (M) et pyrazinamide (Z) suivis de 2 mois de traitement avec la double combinaison R207910 et M ont conduit à une négativation des cultures à la fin des 4 mois de traitement mais le taux de rechutes fut de 40%. Pour le même traitement, si la phase de continuation sans Z est prolongée de 2 mois, le taux de rechutes baisse significativement pour atteindre 11%, taux de rechute similaire à celui obtenu avec le traitement standard de la tuberculose à bacilles sensibles dans la même étude. Ainsi, le R207910 permet d'envisager la mise au point d'un traitement de la tuberculose à bacilles multirésistants de même durée que celui de la tuberculose à bacilles sensibles.

Mise au point d'un modèle expérimental d'infection à mycobactéries à croissance rapide

Objectif

M. chelonae et *M. abscessus* sont des mycobactéries de l'environnement opportunistes dites « à croissance rapide », qui sont très résistantes aux antibiotiques. Elles peuvent être responsables d'infections cutanées et pulmonaires, de surinfections graves chez les patients atteints de mucoviscidose (*M. abscessus*) et aussi d'infections disséminées chez les grands immunodéprimés. Le traitement consiste habituellement en l'administration de 2 à 3 antibiotiques pendant plusieurs mois, dont l'un au moins (et au moins dans la première phase) par voie injectable. C'est un traitement très lourd, pas toujours efficace, instauré sur de seules données de sensibilité in vitro (dont on peut parfois douter de la fiabilité) sans que les modalités aient été définies par des études préalables chez l'homme ou chez l'animal. L'objectif de notre travail, soutenu par le pôle de compétitivité Ile-de-France (Medicen), a donc été de mettre au point des modèles d'infection expérimentale à *M. chelonae* et à *M. abscessus*, dans le but d'étudier l'activité de différents antibiotiques, utilisés seuls ou en association.

Résultats

Souris immunocompétentes



Chez les souris immunocompétentes, après inoculation IV d'environ 10^7 bacilles, *M.chelonae* et *M. abscessus* ne se multiplient ni dans le foie, ni dans la rate, ni dans les poumons. Ils sont progressivement éliminés de ces organes (ex : 10^4 à 10^5 *M. abscessus* et 10^3 *M.chelonae* à J28). En revanche, *M. abscessus* se multiplie dans les reins (jusqu'à atteindre une population de 10^7 *M. abscessus* R à J28), ce que *M.chelonae* ne fait pas (10^2 à J28). L'évolution du nombre de bacilles de *M. abscessus* est très peu différente chez les 3 souches de souris immunocompétentes étudiées (BalbC, Swiss et C57 Black), avec toutefois un petit avantage pour la souris BalbC.

Souris immunodéprimées

Chez les souris immunodéprimées (souris Nude, souris KO *Ifng*^{-/-} et *Tnf*^{-/-}, souris A/J et souris Beige), comme chez les souris immunocompétentes, il n'y a pas de multiplication de *M. chelonae* ni de *M. abscessus* dans le foie et dans la rate. L'élimination est toutefois plus lente que chez les souris immunocompétentes, en particulier chez les souris Nude (autour de 10^6 *M. abscessus* à J28, soit 2 log 10 de plus que chez les souris immunocompétentes). *M. abscessus* ne se multiplie pas non plus dans les poumons des souris immunodéprimées, son élimination étant un peu moins rapide que chez les souris immunocompétentes (environ 10^5 bacilles à J28 soit 2 à 3log10 de plus que chez les souris immunocompétentes). Dans les reins, *M. abscessus* se multiplie très fortement, particulièrement chez les souris KO *Tnf*^{-/-} (jusqu'à 10^9 à 10^{10} *M. abscessus* S à J28, soit 2 log de plus que chez les souris BalbC).

De manière générale, on observe un avantage des souris Nude et des souris KO sur les souris immunocompétentes. A noter aussi un avantage des souris A/J avec *M. abscessus* R. En revanche il n'y a pas d'avantage évident avec les souris Beige.

Au total, un modèle d'infection à *M. abscessus* est maintenant au point chez la souris Nude. Il permettra d'évaluer l'activité des antibiotiques en monothérapie puis en association.

Ulcère de Buruli

Finalisée en 2008, l'expérience entreprise en 2007 sur l'activité stérilisante (= mesure du taux de rechute à l'issue de l'arrêt du traitement) de plusieurs régimes thérapeutiques par voie orale a montré qu'aucune souris traitée par l'association de la rifampicine-clarithromycine n'a rechuté, alors que la moitié des souris traitées par l'association moxifloxacine-clarithromycine a rechuté.

L'activité bactéricide et stérilisante d'une administration 5 fois par semaine (5 / 7) de rifapentine 5 mg/kg, seule ou en combinaison, sont pratiquement identiques à celles du régime correspondant composé de rifampicine 10 mg/kg. Néanmoins, en raison de sa longue demi-vie de la rifapentine, il est possible que la rifapentine administrée 5 jours sur 7 puisse s'accumuler et être responsable de toxicité.

L'activité bactéricide de fortes doses de rifapentine (20 mg/kg) en monothérapie ou en association avec 150 mg/kg de streptomycine ou 200 mg/kg de moxifloxacine administrées deux fois par semaine, est aussi efficace que les régimes contenant 10 mg/kg de rifampicine administrés 5 jours sur 7, ce qui suggère que l'ulcère de Buruli peut être traité de façon intermittente par des combinaisons à base de rifapentine.

Nous avons entrepris en 2008 une expérience visant à mesurer l'impact d'un espacement des doses du traitement standard rifampicine – streptomycine sur la guérison de l'ulcère de Buruli, afin de mimer les différentes conditions d'application sur le terrain : dose quotidienne, 5 jours sur 7, 4 jours sur 7, 3 jours sur 7 et 2 jours sur 7.

Les premiers résultats suggèrent que l'activité stérilisante diminue beaucoup avec l'espacement des doses, même lorsque le traitement est prolongé au-delà des 8 semaines recommandées par l'OMS. Ceci justifierait le choix sur le terrain entre 8 semaines de traitement, ce qui est quasi impossible à assurer en routine, ou 10 à 12 semaines de traitement 5 jours sur 7, ce qui correspond mieux au fonctionnement des centres de soins en pays d'endémie.

7. Liste des publications et communications 2008

Publications internationales



- MATRAT S, CAMBAU E, JARLIER V, AUBRY A. Are all the DNA gyrase mutations found in *Mycobacterium leprae* clinical strains involved in resistance to fluoroquinolones? *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:745-7
- MATRAT S, AUBRY A, MAYER C, JARLIER V, CAMBAU E. Mutagenesis in the alpha3alpha4 GyrA helix and in the Toprim domain of GyrB refines the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase to intrinsic resistance to quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2909-14
- N'GUESSAN KR, DOSSO M, EKAZA E, KOUAKOU J, JARLIER V. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from new cases in Lagunes region (Côte d'Ivoire). *Int J Antimicrob Agents*. 2008 May;31(5):498-500.
- BROSSIER F, VEZIRIS N, JARLIER V, SOUGAKOFF W. Performance of MTBDR plus for detecting high/low level of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to isoniazid. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009 Feb;13(2):260-5.
- JI B, CHAUFFOUR A, ROBERT J, JARLIER V. Bactericidal and sterilizing activities of several orally administered combined regimens against *Mycobacterium ulcerans* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jun;52(6):1912-6.
- KHUË PM, PHUC TQ, HUNG NV, JARLIER V, ROBERT J. Drug resistance and HIV co-infection among pulmonary tuberculosis patients in Haiphong City, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 Jul;12(7):763-8.
- KHUË PM, MALLET A, VEZIRIS N, JARLIER V, ROBERT J; 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*. 2008 Sep;136(9):1172-8.
- LAVOLLAY M, ARTHUR M, FOURGEAUD M, DUBOST L, MARIE A, VEZIRIS N, BLANOT D, GUTMANN L, MAINARDI JL. The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. *J Bacteriol*. 2008 Jun;190(12):4360-6.

Publications nationales

- N. VEZIRIS, V. JARLIER. Les nouveaux antituberculeux. *BEH* 2008 (10-11):72-74.
- RÉGNIER S, MARTINEZ V, VEZIRIS N, BONVALLOT T, MENINGAUD JP, CAUMES E. [Treatment of cutaneous infections due to *Mycobacterium fortuitum*: two cases]. *Ann Dermatol Venereol*. 2008 Aug-Sep;135(8-9):591-5.
- ROBERT J, VEZIRIS N; RESEAU AZAY-MYCOBACTERIE ET LE CONSEIL SCIENTIFIQUE DE L'ONERBA. [Resistance to antituberculosis drug in France; data provided by the Azay-Mycobacteria network and the National Reference Center on Mycobacteria]. *Med Mal Infect*. 2008 Jun;38 Suppl 2:S68-70.

Communications nationales

- N. VEZIRIS, M. IBRAHIM, C. TRUFFOT-PERNOT, K. ANDRIES, V. JARLIER La diarylquinoline R207910 permet de raccourcir la durée du traitement de la tuberculose dans le modèle murin 12^{ème} congrès de pneumologie de langue française, Lille, France 2008.
- E. KANITZ, N. VEZIRIS, V. JARLIER, M.C. GUTIERREZ, J. ROBERT Dix ans de tuberculose XDR en France : incidence et facteurs de risque. 28^{ème} réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris, France 2008.
- A. PREVOTAT, S. BONNE, F. FORTIN, N. VEZIRIS, E. SENNEVILLE³, Y. YAZDANPANA, L. LEGOUT. Infection pulmonaire à *Mycobacterium abscessus* : place des nouvelles molécules. 28^{ème} réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris, France 2008.
- CAMBAU E, BETTELI L, RADOMSKI, HAENN S, MOULIN L, LUCAS F. Détection des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau. 10^{ème} Journées de Veille sanitaire, novembre 2008, Paris
- F. ANTOUN, H.P. MALLET, T. LLORET, B. DAUTZENBERG, V. JARLIER, C. TRUFFOT. Description d'une épidémie de 118 cas de tuberculose dans un foyer de migrants à Paris. 12^e Congrès de pneumologie de langue française, Lille, Février 2008.



E. KANITZ, N. VEZIRIS, V. JARLIER, C. GUTIERREZ, J. ROBERT. La tuberculose à bacilles ultra-résistants (XDR) en France de 1998 à 2007. 19e Congrès de pneumologie de langue française, Lyon, Janvier 2009.

Communications internationales

S. MATRAT, W. SOUGAKOFF, V. JARLIER, E. CAMBAU, A. AUBRY. Role in quinolone resistance of the new DNA gyrase mutations, T73A+A83E in GyrA and R411H in GyrB, found in clinical MDR and XDR strains of *M. tuberculosis*. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008.

S. PETRELLA, N. ZIENTAL-GELUS, V. JARLIER AND W. SOUGAKOFF. 2008. Crystal structure of the pyrazinamidase PncA from *Mycobacterium tuberculosis*. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington.M. IBRAHIM, C. TRUFFOT-PERNOT, K. ANDRIES, V. JARLIER, N. VEZIRIS; Sterilizing Activity of a Second Line Regimen Including R207910 (TMC207) in Murine Tuberculosis. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington.

M. IBRAHIM, C. TRUFFOT-PERNOT, K. ANDRIES, V. JARLIER, N. VEZIRIS; Early and Late Bactericidal Activity of R207910 (TMC207) in Murine Tuberculosis. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington.

A. CARBONNE, I. ARNAUD, F. BROSSIER, I. BOUGMIZA, E. CAMBAU, J. MENINGAUD, V. JARLIER, E. CAUMES, P. ASTAGNEAU. Epidemiological study of an outbreak of non-tuberculous Mycobacteria subcutaneous infections after mesotherapy. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 19-22 April, 2008.

K. ANDRIES, A. KOUL, N. LOUNIS, J. GUILLEMONT, V. JARLIER. A diarylquinoline targeting the energy supply of *M. tuberculosis*. World Conference on Magic Bullets, Nuerenberg, Germany, 3-5 October, 2008

Conférences sur invitations

E. CAMBAU. ESCMID Professional affairs workshop, (Roma, October 2008): Why is the workflow in clinical microbiology so slow? Can we get it quicker?

E. CAMBAU. Département de Maladies infectieuses, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière : Aspects microbiologiques de l'épidémie d'infections post mésothérapie à *Mycobacterium chelonae*, Octobre 2008

VEZIRIS N Diagnostic microbiologique de la maladie tuberculeuse : Quelles techniques de prélèvements pour quelles situations ? 12^{ème} congrès de pneumologie de langue française, Lille, France 2008

VEZIRIS N Mycobactéries atypiques : Epidémiologie des mycobactérioses. 12^{ème} congrès de pneumologie de langue française, Lille, France 2008

VEZIRIS N Prise en charge des tuberculoses résistantes et multirésistantes, Service de Pneumologie, hôpital Ambroise Paré, 2008.

VEZIRIS N, JARLIER V Nouveautés diagnostiques de la tuberculose, Service de pneumologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 2008.

VEZIRIS N. Tuberculose : nouveaux outils diagnostiques, Institut Mutualiste Montsouris, 2008.

Tuberculose : épidémiologie, clinique et thérapeutique. Laboratoire Biomnis, Lyon, 2008.

VEZIRIS N. Tuberculose à bacilles multirésistants. Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, 2008.

VEZIRIS N : Epidémiologie et Traitement des infections à Mycobactéries atypiques, GERICCO, 2008.

VEZIRIS N. Tuberculose à *Mycobacterium tuberculosis* ultra-résistant "XDR" : épidémiologie et prise en charge. 9e Journées Nationales d'Infectiologie Marseille, 2008

VEZIRIS N. Actualités de la Tuberculose Pulmonaire. Conférences d'actualité, Service de Pneumologie, Rouen, 2008.

VEZIRIS N. *Mycobacterium tuberculosis* : résistance, multirésistance, ultrarésistance. Décoder la tuberculose en 2008. Lyon.

VEZIRIS N. Tuberculose multirésistante. Congrès francophone pédiatrique de pneumologie et d'allergologie. Paris, 2008.



- VEZIRIS N. Nouvelles techniques dans le diagnostic des infections à mycobactéries, traitement des mycobactérioses. Service de Médecine Interne, Hôpital de la Croix Saint-Simon, Paris, 2008.
- JARLIER V. News on the management of MDR and XDR tuberculosis. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, April 2008
- JARLIER V. How rapid diagnostics in microbiology can change the management of patients. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, April 2008
- JARLIER V. Doctor tests or "bedside-microbiology testing": can it help in the therapeutic management? The point of view of the Clinical Microbiologist. Moving Forward in Co-operation-ESCMID, Rome, Italy, October 9-10, 2008.
- JARLIER V. Ce que les modèles animaux pourraient apporter à la définition de nouveaux traitements de la tuberculose, 12^e Congrès de Pneumologie, Lille, 8-11 février 2008.
- JARLIER V. Bases du diagnostic de la tuberculose. Journées Francophones de Pathologie Digestive, Paris, 12 mars 2008.
- JARLIER V. Antituberculeux en cours de développement. 3èmes Rencontres Nord-Sud, Paris, 25 novembre 2008.
- JARLIER V. Overview on Multi-drug Resistance Tuberculosis. INSERM : new trends in infectious diseases, Lyon, 26-27 novembre 2008.
- JARLIER V. Infections à Mycobacterium. 28e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuses, Paris, 4-5 décembre 2008.

8. Programme d'activité 2009-2010

Pour 2009, nous faisons la demande du transfert du laboratoire associé du CNR-MyRMA de l'hôpital Henri Mondor au groupe hospitalier Saint-Louis - Lariboisière. Cette demande est justifiée par la mutation du Pr Emmanuelle Cambau, responsable du laboratoire associé depuis 2006, qui rejoint une équipe qui a une expertise importante en matière de tuberculose et d'infection à mycobactéries, en particulier sur l'immunologie de la tuberculose, ce qui renforce cette partie. Le regroupement des hôpitaux Saint-Louis et Lariboisière qui sera achevé en 2010 permet de renforcer les locaux, les équipements et le personnel technique et médical, en complémentarité des activités du laboratoire coordinateur en mycobactériologie, ce qui permettra de développer en particulier les activités du laboratoire associé lié aux mycobactéries atypiques et à l'immunologie de la tuberculose. Le projet de transfert a été soumis au Département des maladies infectieuses de l'InVS.

En terme d'activité, les projets pour 2009-2010 sont les suivants :

En matière d'expertise :

- (a) consolider la remontée vers le CNR-MyRMA des souches de *M. tuberculosis* complex 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) entreprendre l'évaluation de la trousse de détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques de seconde ligne GENOTYPE MTBDR SL (HAIN). Cette trousse permet à partir d'une culture positive ou d'un prélèvement pulmonaire positif à l'examen microscopique une identification rapide de la résistance à l'éthambutol, aux aminosides et aux fluoroquinolones
- (b) entreprendre l'évaluation de l'automate XPERT MTB (CEPHEID) permettant l'extraction automatique d'ADN et la détection moléculaire de *Mycobacterium tuberculosis* et de la résistance à la rifampicine en moins d'une heure, directement à partir du prélèvement.



(c) poursuivre l'amélioration de 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.

(d) finaliser la mise au point de la trousse de détection de la résistance de *M. leprae* et mettre en place la surveillance OMS de la résistance secondaire (rechutes de lèpre).

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 en France.

(b) quantifier les délais entre le diagnostic et le début d'un traitement efficace.

(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 autres 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:

poursuivre la mise en place de la technique MIRU-VNTR en remplacement de la RFLP. Nous avons commencé la détermination des codes MIRU des souches MDR isolées en 2006 et 2007 afin de comparer le pouvoir discriminant de cette méthode à celui de la méthode de typage RFLP. D'ores et déjà, il apparaît que la technique MIRU est moins performante que la RFLP pour distinguer les cas de transmission directe lorsque les souches appartiennent à la famille Beijing. Pour ces souches, nous devons donc envisager l'implantation d'une approche complémentaire de type spoligotypage afin de compléter l'analyse MIRU-VNTR.

En matière de surveillance en réseau :

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

(b) participer au réseau européen de surveillance de la tuberculose MDR,

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

(d) achever le recensement et l'analyse des cas de méningite tuberculeuse bactériologiquement confirmés (tous âges confondus) dans le cadre de l'enquête qui a lieu tous les 5 ans

En matière de mécanismes de résistance :

Poursuivre le travail sur

(a) la pyrazinamidase afin d'optimiser les performances de la détection moléculaire de la résistance. Les activités enzymatiques d'une large collection de mutants PncA issus de souches cliniques seront déterminées et corrélées à la localisation de la mutation dans la structure 3D que nous venons de déterminer.

(b) l'isoniazide pour définir le site de liaison de l'INH dans la protéine KatG et mieux comprendre le rôle des mutations de KatG autres que S315T.

(c) les diarylquinolines pour préciser le mécanisme d'inhibition de l'ATP synthase. Nous envisageons d'améliorer notre système isogénique d'analyse des mutations en inactivant le gène chromosomique codant pour la sous-unité C de l'ATP synthase dans la souche réceptrice recevant les plasmides recombinants. En parallèle, nous poursuivrons l'optimisation du modèle structural d'interaction entre la sous-unité C et le RJ207910 et entreprendrons les premiers tests d'expression de la sous-unité C en vue de réaliser une étude cristallographique de la structure de ce polypeptide.

(d) entreprendre la mise au point d'un traitement des infections à *M. abscessus*.



En matière d'étude de la **physiologie mycobactérienne** :

Entreprendre l'étude des bases moléculaires expliquant les fonctions particulières de l'ADN gyrase, seule topoisomérase de type 2 chez *M. tuberculosis*, comparativement aux ADN gyrases d'espèces à 2 topoisomérases de type 2.

En matière de **recherche thérapeutique** :

- (a) mettre au point un traitement intermittent (uni-hebdomadaire) de la tuberculose à bacilles sensibles
- (b) raccourcir le traitement de la tuberculose MDR
- (c) déterminer la durée optimale du traitement de l'ulcère de Buruli par le schéma OMS rifampicine - streptomycine