



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

**Laboratoire coordinateur**

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

**Laboratoire associé**

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

**Rapport d'activité pour l'année 2013**

**Avril 2014**

# Table des matières

FICHE D'IDENTITÉ DU LABORATOIRE COORDONNATEUR ET DU LABORATOIRE ASSOCIÉ DU CNR-MYRMA .....	1
RÉSUMÉ ANALYTIQUE DES RÉSULTATS 2013 ET MISE EN PERSPECTIVE.....	2
1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR-MYRMA .....	11
2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE .....	11
2.1. Evolution des techniques en 2013 .....	11
2.2. Activités d'expertise assurées par le CNR pour les laboratoires français en 2013 .....	13
3. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE.....	35
3.1. Activités de surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux anti-tuberculeux .....	35
3.2. Surveillance de la lèpre en France .....	48
3.3. Etude génotypique des souches de <i>M.tuberculosis</i> : détection et investigation des cas groupés .....	48
4. ALERTES .....	56
4.1. Alertes et enquêtes 2013 sur des cas de tuberculose .....	56
4.2. Alertes et enquêtes 2013 sur des cas d'infection à mycobactérie atypique.....	56
5. ACTIVITÉS D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	57
5.1. Information .....	57
5.2. Formation.....	57
5.3. Activités de conseil.....	58
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATION EN LIEN AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR-MYRMA ..	61
6.1. Travaux de recherche 2013 ou en cours .....	61
6.2. Publications et communications .....	68
7. COOPÉRATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTÉ ANIMALES, D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENTAUX.....	72
7.1. Santé animale.....	72
7.2. Environnement.....	72
7.3. Alimentation .....	73
8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ 2014 - 2015 .....	74
8.1. Développement et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic.....	74
8.2. Activités de Surveillance .....	75
8.3. Activités d'information, formation, conseils .....	76
8.4. Travaux de recherche en lien avec l'activité du CNR.....	76
ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR-MYRMA.....	80
ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR-MYRMA.....	90



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

- **Laboratoire coordonnateur**

- Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière-Charles Foix (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris)  
47-83 Boulevard de l'hôpital  
75634 PARIS cedex 13  
Téléphone : +33 (0) 1 42 16 20 70 secrétariat, +33 (0) 1 42 16 20 83 bureau CNR-MyRMA  
Fax : +33 (0) 1 42 16 20 72  
Email : [cnr.myctb@psl.aphp.fr](mailto:cnr.myctb@psl.aphp.fr)  
Site Internet : <http://cnrmyctb.free.fr>

- Responsable scientifique : Pr Vincent JARLIER

Téléphone : +33 (0) 1 42 16 20 70, +33 (0) 6 80 08 59 68  
Email : [vincent.jarlier@psl.aphp.fr](mailto:vincent.jarlier@psl.aphp.fr)

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

- **Laboratoire associé**

- Laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), site Lariboisière  
2, rue Ambroise Paré  
75018 Paris cedex 18  
Téléphone : +33 (0) 1 49 95 65 51 secrétariat, +33 (0) 1 49 95 65 54 bureau CNR-MyRMA  
Fax : +33 (0) 1 49 95 85 37

- Responsable scientifique: Pr Emmanuelle CAMBAU

Téléphone : +33 (0) 1 49 95 65 54, +33 (0) 6 80 42 25 08  
Email : [emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr](mailto:emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr)

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



# Résumé analytique des résultats 2013 et mise en perspective

## 1. Structure du CNR-MyRMA

Le CNR-MyRMA repose sur 2 laboratoires :

**Un laboratoire coordinateur**, (laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière à Paris, responsable Pr Vincent Jarlier) a la maîtrise des techniques mycobactériologiques classiques et génotypiques, une longue expérience des antituberculeux (tests de sensibilité, mécanismes de résistance, chimiothérapie expérimentale, conseil thérapeutique) et assure l'animation et la gestion de réseaux de laboratoires (réseau AZAY-mycobactéries et réseau CNR-MyRMA).

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

**L'association des 2 laboratoires** permet d'**assurer la continuité du service** en cas de problème technique (ex. révision d'un des 2 laboratoires de confinement L3) et la **mise en commun de compétences et d'approches techniques complémentaires**.

Le CNR-MyRMA s'appuie aussi sur 2 réseaux partenaires

### **Le réseau Azay-Mycobactéries**

La surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux est basée sur la collaboration volontaire de 39 laboratoires hospitalo-universitaires couvrant toutes les régions métropolitaines françaises sauf la Corse qui n'a pas de CHU

La surveillance assurée à travers ce réseau est standardisée, en particulier pour ce qui est du recueil des informations cliniques et des résultats des épreuves de sensibilité aux antibiotiques de première ligne.

La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis qui ont montré que la sensibilité du réseau et la concordance des données avec celles de la DO étaient satisfaisantes.

### **Le réseau CNR-MyRMA**

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, avec l'aide de l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie (~260 en 2013) la surveillance annuelle du nombre de cas de tuberculose bactériologiquement confirmée (culture positive) et, parmi ces cas, du nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine (« multirésistants » ou « MDR »).

Ce réseau est aussi mis à contribution pour surveiller certaines formes particulières de tuberculose (méningites, *M. bovis*...).

## 2. Améliorations techniques-contrôle de qualité-accréditation

Le CNR-MyRMA dispose de toutes les techniques phénotypiques et génotypiques utiles (cf annexe 2) et met au point ou évalue chaque année de nouvelles techniques, à titre d'exemple en 2013

- une technique de REP-PCR semi-automatisée (DiversiLab®) pour l'identification et la détection de clonalité (génotypage) pour les mycobactéries atypiques
- deux techniques de colorations à l'Auramine

Le CNR-MyRMA participe à des contrôles de qualité externe supranationaux (ECDC, OMS...) et s'est engagé en 2013 dans la démarche d'accréditation.



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

Nous avons reçu **1138 souches et prélèvements en 2013**.

Ce nombre a peu évolué depuis 2007 mais il y a eu **une augmentation importante du travail** effectué sur les souches de *M.tuberculosis* :

- + **24%** du nombre de souches pour antibiogramme de 1<sup>ère</sup> ligne,
- + **148%** du nombre de souches pour antibiogramme de 2<sup>ème</sup> ligne (+10%) par rapport à 2012), ce qui demande un gros travail (nombreux milieux de culture spécifiques non commercialisés, nombreux tests génotypiques),
- + **57%** par rapport à la moyenne des années 2007-2010 du nombre de souches pour génotypage.

**Au total 900 souches ont été soumises à identification, 464 à des tests phénotypiques de sensibilités aux antibiotiques, 375 à des tests génotypiques de sensibilité aux antibiotiques (~1300 tests concernant 12 gènes de résistance) et 203 à des analyse génotypiques à visée épidémiologique (phylogénie ou empreintes digitales génomique).**

### 4. Identification des espèces

Parmi les souches du **complexe *M. tuberculosis***, **87%** étaient de l'espèce ***M. tuberculosis*** qui est l'espèce principale responsable de tuberculose humaine, **4%** de l'espèce ***M. bovis var BCG*** (souches vaccinales), **4%** de l'espèce ***M.bovis*** et **5%** de l'espèce ***M.africanum***. Ces chiffres sont stables depuis plusieurs années.

Parmi les souches de **mycobactéries dites atypiques**, la répartition des principales espèces était la suivante :

- **45% complexe *M. avium-intracellulare***
- **12% *M. xenopi***
- **4% *M.kansasii***
- **22% d'espèces dites « à croissance rapide »**, essentiellement *M.chelonae*, *M. fortuitum* et *M.abscessus*

**Il faut noter que parmi les souches de mycobactéries atypiques :**

- **14 %** des appartenait à des **espèces rares ou nouvellement décrites**,
- **84%** ont été considérées comme **responsables d'infections**, pourcentage élevé en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses efforts sur les souches importantes au plan médical.
- **12 souches (*M.avium*, *M.intracellulare*, *M.malmoense*)** seulement ont été isolées **d'adénites chez des enfants de moins de 5 ans**, fait important dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt de l'obligation vaccinale par le BCG en 2007. Ce nombre, qui avait augmenté de 2006 à 2011, s'est stabilisé depuis 2012.

### 5. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

#### ***M.tuberculosis complex***

#### **Résistance des souches aux antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne**

- 32% étaient sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine (**multisensibles**)
- 68% étaient **résistantes** à au moins un de ces 4 antibiotiques
- dont 56% étaient **multirésistantes (MDR)** c'est-à-dire **résistantes à l'isoniazide et la rifampicine**.

**Entre 2007 et 2013**, la proportion de souches multisensibles a diminué de 52 à 32% et la proportion de souches multirésistantes a augmenté de 22 à 39 %, **chiffres très différents de ceux générés au niveau national. Ce n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour expertise que l'on peut établir des statistiques représentatives de résistance en France. Il faut pour cela des travaux en réseau spécifiquement organisés pour cela** (cf. section « Surveillance»). **En revanche, l'analyse des souches reçues permet une étude précise des mécanismes de résistance.**



### Résistance aux antituberculeux de seconde ligne

- chez les **souches MDR** : streptomycine 73%, éthambutol 66%, pyrazinamide 40%, éthionamide 73%, cyclosérine et PAS 24%, au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 41%, fluoroquinolones 30%.
- chez les **souches non MDR** (contexte : effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine...) : amikacine 1-2%, 5% éthambutol, **1-2% fluoroquinolones**. Ce dernier résultat est rassurant car l'utilisation large des quinolones dans la communauté pour de nombreuses indications fait craindre l'émergence de résistance parmi les souches sensibles ou monorésistantes.

### Augmentation du nombre de souches MDR et XDR

Le nombre moyen de **souches MDR** qui était resté stable entre 2006 et 2010 **autour d'une médiane de 51 par an**, a augmenté en 2011 (n=69) et **en 2012 (n=92) et s'est stabilisé en 2013 (n=83)**. Ceci est dû à la **très forte augmentation du nombre de souches MDR de patients nés dans les pays d'ex-URSS et d'Europe de l'Est, principalement en Géorgie** entre la période 2006 – 2010 (n~10 /an), 2011 (n=27) puis 2012 (n=50), qui semble se stabiliser en 2013 n=(47). En revanche, le nombre de souches MDR de patients nés en France ou dans les autres pays sont restés stables.

Le nombre de **souches XDR** (MDR résistantes en plus aux fluoroquinolones et aux aminosides) qui était de **1 ou 2 par an de 2006 à 2008** (idem depuis 2002) a **augmenté à 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011 17 en 2012 et 22 en 2013**. La **proportion de XDR parmi les MDR a augmenté de 2-3% pour la période 2002 - 2005**, 4-5% en 2006-07, 8% en 2009, 13% en 2010, 18% en 2012 et **27% en 2013**.

**Il faut noter que le CNR-MyRMA a reçu la quasi-totalité des souches MDR-XDR identifiées en France (cf section Surveillance).**

### Mycobactéries atypiques

Les infections a mycobactéries atypique n'étant pas contagieuses, la résistance acquise ne concerne que les échecs thérapeutiques chez des patients déjà traités (sélection de mutants résistants), c'est-à-dire la résistance secondaire.

Les taux de résistance 2aire étaient en 2013 :

- 23 % à la clarithromycine pour ***M.avium-intracellulare complex*** (25% en moyenne pour 2006-13)
- 0% à la clarithromycine pour ***M.xenopi*** (5% en moyenne pour 2006-13)
- 0% à la rifampicine pour ***M.kansasii*** (idem pour 2006-2013)

## 6. Mutations impliquées dans la résistance acquise aux antibiotiques

Les principaux types de mutation conférant la résistance prévalant en France chez ***M.tuberculosis*** sont les suivants :

- **Rifampicine** : mutations dans le gène ***rpoB*** pour **toutes les souches résistantes**, essentiellement S531L (69%), le reste dans les codons 505 et 533.
- **Isoniazide** : mutation **en 315 dans le gène *katG* (77%)** (résistance de haut niveau) dont surtout **S315T (73%) et/ou** mutation de type « -15 c->t » dans la **région régulatrice du gène *inhA* (19%)** (résistance de à bas niveau si mutation isolée).

Les souches résistantes à l'isoniazide pour lesquelles on n'a pas détecté de mutation dans ***katG*** ou ***inhA*** représentent 5 à 15 % de l'ensemble des souches testées selon les années.

- **pyrazinamide** : toujours une très grande diversité des mutations identifiées dans le gène ***pncA*** ce qui rend difficile l'interprétation de l'effet des mutations sur la résistance.
- **Fluoroquinolones** : mutations les plus fréquentes aux positions 94 (42%) et 90 (33%) du gène ***gyrA***.
- **Ethionamide** : grande diversité de mutations dans le gène ***ethA***.
- **Kanamycine, amikacine et capreomycine** : mutations a1401g dans le gène ***rrs***.
- **Ethambutol** : mutations M306V ou M306I dans le gène ***embB***.

Les mutations impliquées dans la résistance **des mycobactéries atypiques** sont : 2058 A>G dans le gène ***rrl*** codant l'ARN 23S pour la clarithromycine et A1401G du gène ***rrs*** codant l'ARNr16S pour l'amikacine.



Résistance aux antibiotiques pour les **24 cas de lèpre** (18 nouveaux cas, 6 rechutes ; 13 patients de Mayotte, 4 de Nouvelle Calédonie, 1 de Guadeloupe, 6 en métropole chez des migrants) : 1 souche résistante aux quinolones (mutation A91V dans *gyrA*) et 2 à la dapsonne (mutation T53I ou P55L dans *folP*).

## 7. Surveillance des taux et des caractéristiques de la résistance primaire et secondaire à travers le réseau Azay-mycobactérie (CHU)

### *Caractéristiques générales des cas de tuberculose à culture positive servant à calculer les taux*

**En 2012 (1576 cas, recueil fait en 2013) :** 8,5 % antécédents de traitement, 7,3% VIH+ , 63% nés à l'étranger.

#### **Evolution depuis 1995 :**

- **stabilité** de la **proportion des patients avec antécédents de traitement**, en faveur d'une **prise en charge convenable** de la tuberculose en France (indicateur de qualité),
- **stabilité** de la **proportion de VIH+** qui montre que la co-infection tuberculose-VIH est peu fréquente en France et que l'impact de l'épidémie du **VIH sur l'épidémiologie de la tuberculose est modeste**.
- **augmentation de la proportion de nés à l'étranger** : 35% dans les années 1990, plus de 50% depuis 2002, 63% en 2012. La plupart des pays d'Europe de l'Ouest (cf rapports OMS) constatent une évolution de ce type.

### **Taux de résistance « primaire » (patients sans antécédents de traitement)**

- 10% à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne
- 6,5 % à l'isoniazide
- 2,3% à la rifampicine (RMP 2,3%)
- 1,4 % à l'éthambutol (EMB, 1,4%)

**Le taux de résistance 1aire à isoniazide a significativement augmenté** (3,7% en 1995). Pour les détails et la publication afférente, cf. le rapport 2012. **Ceci confirme l'importance de maintenir en France les recommandations thérapeutiques de quadrithérapie (c.a.d. avec éthambutol) pour les nouveaux cas.**

La quasi-totalité des cas résistants à la rifampicine chez les patients sans antécédents de traitement (27/29) étaient aussi résistants à l'isoniazide (multirésistance). Le taux de **multirésistance 1aire** mesuré en 2012 (2,2%) **est le double de celui de 2010 et 2009** (1%).

#### **Le taux de résistance 1aire diffère selon le pays de naissance :**

- à au moins 1 antituberculeux : 8,8% chez les patients nés en France mais 10,9% chez ceux nés à l'étranger
- à la rifampicine : 1,2% chez les patients nés en France mais 2,9% chez ceux nés à l'étranger

### **Taux de résistance « secondaire » (patients avec antécédents de traitement)**

- 31,3% à au moins un des 4 antituberculeux (3 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas)
- 25,2% à l'isoniazide (16,7 % en 1995)
- 21,4% à la rifampicine (7,9% en 1995)

Ces **augmentations importantes** sont liées au triplement du nombre de cas de tuberculose à bacilles MDR (7% en 1995, 20% en 2012) chez les patients ayant déjà reçu un traitement.

#### **Le taux de résistance 2aire diffère selon le pays de naissance :**

- **tous les cas de multirésistance 2aires** ont été diagnostiqués chez des patients nés à l'étranger
- le taux de résistance « 2aire » à chacun des 4 antituberculeux était bas chez les patients nés en France.

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

Nous avons recensé **4038 cas de tuberculose à culture positive à travers les 260 laboratoires du réseau**, dont la moitié concentrés dans les 20 laboratoires dont l'activité est la plus importante : 14 CHU (8 Ile de France et 6 autres régions), 4 hôpitaux généraux d'Ile-de-France et 2 gros laboratoires privés. Malgré cela, **les cas MDR sont répartis dans 46 laboratoires** et 14% ont été identifiés dans des laboratoires diagnostiquant moins de 20 cas de tuberculose par an. **Ceci justifie le gros travail d'exhaustivité mené par le CNR-MyRMA pour intégrer**



dans le réseau tous les laboratoires du territoire national qui pratiquent la mycobactériologie.

#### **Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants en 2012**

Le réseau a recensé en 2012 (recueil fait en 2013) **94 cas de tuberculose MDR**, soit **2,3 % (IC : 1,9%-2,8%)** du total des cas de tuberculose.

Parmi les 93 cas de métropole, 2 (2,2%) concernaient des patients déjà identifiés les années précédentes (cas à rechutes) et 91 des patients identifiés pour la 1<sup>ère</sup> fois en 2012.

Le % de cas MDR (2,3%) calculé sur les 4038 cas diagnostiqués par l'ensemble des laboratoires français qui pratiquent la mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) est inférieur à celui calculé sur les 1558 cas de tuberculose diagnostiqués par les 39 laboratoires de CHU du réseau Azay-Mycobactéries (3,7%), probablement en raison du caractère spécialisé des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU. Ceci montre l'intérêt de **travailler avec 2 réseaux complémentaires**.

#### **Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants en 2012**

**Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR diagnostiqués en 2012 en métropole sont les suivantes** : 73% d'hommes, 89% nés à l'étranger (2/3 en Europe de l'Est dont 1/3 en Géorgie, 22% en Afrique sub-saharienne, 7% au Maghreb, 6% en Asie), âge médian 32 ans, 5% VIH+, 86% forme pulmonaire, 51% sans antécédents de traitement (MDR « 1aire »).

#### **Tendances évolutives 1992-2012**

**Le % de cas MDR a beaucoup augmenté depuis le début de la surveillance en 1992** : 0,4-0,7% durant la période 1993-1998 ; 0,9% en 1999-2001 ; 1,1-1,4 % en 2002-2010 ; 1,7% en 2011 ; 2,3% en 2012.

Le nombre de cas a augmenté dans les régions :

- **Rhône Alpes** (5-6 cas/an en 2006-2010 ; 14 en 2011 et 11 en 2012),
- **Provence-Côte d'azur** (1-4 cas/an en 2006-2010 ; 9 en 2011 et 5 en 2012)
- **Bretagne et Poitou-Charentes** (0-3 cas/an en 2006-2011 et 5 en 2012)
- **Ile-de-France** (~30 cas/an avant 2011 ; 36 en 2011 et 40 en 2012)

**L'Ile-de-France cumule la moitié (52%) du total des cas MDR recensés de 2006 à 2012.**

**Les caractéristiques des cas MDR se sont beaucoup modifiées** durant les 19 années de la surveillance :

- **diminution constante** des proportions représentées par les **hommes** (74 à 58%), par les patients avec **antécédents de traitement** (73% à 37%), et par les patients **nés en France** (47% à 10%).
- **augmentation** de la proportion de **patients nés à l'étranger** (53% à 90%), essentiellement en Europe de l'est et ex-URSS.

## **9. Surveillance de formes particulières de tuberculose**

- **tuberculose à *M.bovis*** (réseau AZAY-Mycobactéries des CHU) : les cas à *M. bovis* représentaient au plus 2% des cas de tuberculose humaine en 2011 et 2012. Comparativement à l'ensemble des cas, ceux à *M.bovis* étaient moins souvent des hommes (45 vs.65% p<0,01), plus souvent nés au Maghreb (54 vs 14% p<0,01) et de forme extrapulmonaires (66 vs 37% p<0,01).

- **méningite tuberculeuse chez les enfants de ≤ 5 ans** (indicateurs pour juger de l'impact de la politique de vaccination par le BCG) : Il **semble y avoir une légère augmentation du nombre de cas** en 2012 (5 cas), par rapport aux années précédentes (0 à 2 cas/an) à confirmer par un recueil d'informations sur ces cas (en cours).

## **10. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux de la tuberculose**

Les données du réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance 1aire/2aire sont envoyées à l'ECDC et à l'OMS.

Le CNR-MyRMA utilise en routine la technique MIRU-VNTR 24 loci pour le génotypage de *M.tuberculosis* et nous avons intégré en 2009 le groupe « Molecular surveillance of MDR/XDR-TB in Europe », coordonné par l'ECDC et le National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas). Dans le cadre de ce programme, le CNR-MyRMA participe aux contrôles de qualité européen de génotypage.





## 11. Surveillance de la lèpre en France

Nous menons la surveillance de la lèpre en France au travers des prélèvements de patients résidant en France (24 cas en 2013, cf §) : 13 de Mayotte (13 nouveaux cas), 4 de Nouvelle Calédonie (1 nouveau cas, 3 rechutes), 1 de Guadeloupe (rechute) et 6 de France chez des migrants de régions où la lèpre est encore présente.

Depuis 2013, **surveillance systématique des cas de lèpre de Mayotte** (région de France à forte incidence : ~30 cas /an soit ~15 cas/100 000) avec le Médecin léprologue de l'île : (a) données historiques pour chaque cas (famille, mode de vie...) et (b) analyse bactériologie (microscopie, gènes de résistance) de tous les cas multibacillaires, soit 15 cas en 2013.

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

### **Complément bactériologique des enquêtes épidémiologiques autour de cas non MDR**

Le génotypage a permis de **confirmer la relation entre les cas dans 15 des 27 situations** soumises à enquête (**total 51 cas**).

Ces 15 situations comportaient chacune de **2 à 11 cas bactériologiquement reliés** :

- 2 fois au sein de familles (2 fois 2 cas),
- 2 fois au sein d'une école (1 épisode de 2 cas ; 1 cas lié à 10 cas de 2012, soit 11 cas au total sur 2 ans),
- 1 fois au sein d'un foyer de travailleurs migrants (10 cas suspects correspondant en fait 3 groupes de 2 cas liés avec des souches différentes + 4 cas sporadiques),
- 8 fois dans un contexte amical ou de travail (4 fois 2 cas ; 1 fois 3 cas ; 1 fois 5 cas ; 1 fois 5 cas aussi liés à 4 cas de 2012, soit 9 cas au total sur 2 ans ; 1 épisode de 10 cas correspondant en fait à 2 groupes de 8 cas et 2 cas, chacun avec une souche distincte),
- 1 fois dans un milieu carcéral (4 cas liés aussi à 2 cas de 2012, soit un épisode de 6 cas au total sur 2 ans).
- 1 fois en milieu de soins (3 cas liés à 2 cas de 2012, soit 5 cas au total en 2 ans).

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

**Le nombre d'enquêtes autour d'un cas pour lesquelles le CNR-MyRMA a apporté son expertise a augmenté** de 20 en moyenne pour la période 2006-2011 à 30 pour les 2 années 2012 et 2013, montrant l'intérêt des structures en charge (CLAT) pour les confirmations moléculaires de la transmission.

### **Etude systématique des souches multirésistantes (MDR) et ultrarésistantes (XDR)**

La proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing est passée de 19 à 49 % entre 2006 et 2013, en relation avec l'augmentation de la part des cas MDR chez des patients nés en ex-URSS.

L'analyse des résultats révèle l'existence de **9 clusters de souches pour un total de 38 souches (46%) partageant des codes MIRU 24 identiques** : 5 de lignée Beijing, 1 de lignée LAM, 1 de lignée URAL, 2 de « nt » et 1 de lignée S. La technique MIRU24 n'étant pas très discriminante au sein de la lignée Beijing, le regroupement de souches en cluster doit être analysé avec prudence avant de conclure à un lien bactériologique, et encore plus à un lien épidémiologique. Chaque cluster a donc été analysé **en tenant compte des caractéristiques des souches (phénotype et génotype de résistance) et de caractéristiques des patients (pays de naissance, ville où le diagnostic a été fait, liens familiaux)**.

**L'analyse détaillée des 9 clusters** a permis de confirmer un lien bactériologique et épidémiologique pour : 2 frères nés en Géorgie (souche XDR de lignée Beijing) ; 2 contacts sur lieu de travail (nés en France et en Géorgie, souche XDR de lignée Beijing) ; 2 contacts en foyer (nés en Arménie et en Tchécquie, souche MDR de lignée Beijing) ; Mère et fils nés en Géorgie (souche MDR de lignée Beijing) ; Mère et fils nés en Guinée (souche MDR de lignée Beijing) ; Mari et femme nés au Sénégal (souches MDR de lignée nt) ; 2 contacts sur le lieu de travail (nés en Algérie, souche MDR de lignée S).



**Au total :**

- la quasi totalité des cas liés avec des souches MDR de la lignée Beijing ont concerné des patients nés dans des pays où ces souches sont prévalentes. A noter cependant 2 cas de transmission de souche MDR Beijing chez des patients nés en Guinée (transmission intrafamiliale) et entre géorgien et français sur un lieu de travail.

- on est passé de 1 ou 2 cas de transmission en France de souches MDR pour la période 2006-2009 à 4 cas en 2010-2012 et 7 en 2013.

### 13. Alertes

Le CNR-MyRMA a été mis à contribution par les autorités de santé en tant qu'expert lors de 7 alertes de cas de tuberculose (3 alertes) ou d'infections à mycobactéries atypiques en situation iatrogène (4 alertes).

### 14. Information et formation

Le site internet <http://cnrmyctb.free.fr> a été régulièrement mis à jour pour : (a) fiche d'information pour demande d'expertise bactériologique, (b) fiches des enquêtes annuelles sur la tuberculose multirésistante et la méningite tuberculeuse, (c) résultats annuels de la surveillance de la tuberculose multirésistante et de la résistance primaire et secondaire, (d) nouvelles publications du CNR-MyRMA, (e) rapports d'activité du CNR-MyRMA, (f) diapositives des formations organisées ou co-organisées par le CNR-MyRMA.

Nous avons accueilli 10 stagiaires en 2013 pour une durée totale de 30 mois, **soit une moyenne de 3 stagiaires présents tout au long de l'année.**

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

47 patients MDR ou XDR ont fait l'objet de conseils thérapeutiques et de prise en charge des malades lors de 14 réunions du « **Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile** » (total 193 revues de dossiers car chaque patients est discuté plusieurs fois tout au long du traitement, pour modifications et adaptations)

Les participants du « Groupe Thérapeutique » sont (a) l'équipe du CNR-MyRMA, (b) 3 praticiens du Centre Médical de Bligny, (c) 1 pédiatre (hôpital Trousseau), (d) 2 pneumologues (Amiens et Pitié-Salpêtrière), (e) 1 membre du SAMU social de Paris, (f) 1 infectiologue (Pitié-Salpêtrière)

**L'activité du « Groupe thérapeutique » (nombre de revues de dossiers), qui avait déjà augmenté de 50% de 2009 à 2011 (46 à 70), puis doublé entre 2011 et 2012 (148), a encore augmenté de 30% en 2013 (193).**

### 15. Travaux de recherche 2013 ou en cours

Le CNR-MyRMA est adossé à l'équipe de recherche ER5 (EA 1541), UPMC site Pitié-Salpêtrière. Les travaux de recherche ont porté en 2013 sur :

#### **a. La chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries :**

- facteurs déterminant in vivo la sélection des mutants résistants aux antituberculeux
- activité stérilisante de traitements intermittents oraux dans l'infection à *M. ulcerans*.

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

#### **c. Les mécanismes de résistance chez les mycobactéries :**

- aux diarylquinolines chez *M. tuberculosis* (structure de l'ATP)



- aux fluoroquinolones chez *M.tuberculosis*
- aux aminosides/peptide cyclique dans les souches cliniques multirésistantes de *M.tuberculosis*
- aux antibiotiques actifs sur les mycobactéries atypiques à croissance lente (approches épidémiologique et moléculaire)

**d. Le développement d'une stratégie génomique pour comprendre le succès des souches MDR de la lignée Beijing**

## 16. Publications et communications en relation directe avec le travail mené au CNR-MyRMA

- 3 publications nationales
- 14 publications internationales
- 2 chapitres d'ouvrages
- 9 communications nationales
- 9 communications internationales
- 15 conférences sur invitation nationales
- 12 conférences sur invitation internationales

## 17. Santé animale et environnement

Nous collaborons avec nos collègues des laboratoires en santé animale (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Zoo du Bois de Vincennes...) lorsque se pose une question sur les liens potentiels entre la tuberculose humaine et animale, à la demande des autorités sanitaires, lors d'un événement ponctuel, ou pour expertise lorsqu'une souche d'origine animale est d'identification difficile.

Nous participons aux réunions communes avec la Mutuelle de Santé Agricole (MSA) pour les conseils et les investigations (a) de la tuberculose à *M.bovis* chez les éleveurs, (b) sur les épidémies de tuberculose bovine détectées dans les élevages et chez les animaux sauvages.

Le risque de contracter une infection à mycobactéries dites « atypiques » à partir de l'environnement est bien connu, lors d'activités de loisir (baignade, aquariophilie) et de soins (mésothérapie, chirurgie). Nos activités dans ce domaine concernent les développements techniques et l'expertise lors d'événements précis (cf alertes ci-dessus).

Nous avons mis au point plusieurs méthodes de détection des mycobactéries dans les eaux : culture après filtration et concentration ; PCR temps réel (gènes codant l'ARN16S et gène *atpE*). Ces méthodes sont appliquées aux eaux propres des réseaux et aux eaux sales lors d'épidémies d'infections cutanées.

## 18. Programme 2014

### Développement et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic

- Nouvelle méthode d'étude de la sensibilité de *M.tuberculosis* vis-à-vis des antituberculeux de première et seconde ligne
- Identification des mycobactéries atypiques par spectrométrie de masse MALDI-ToF

### Activités de Surveillance

#### Résistance aux antituberculeux

- Taux de résistance primaire et secondaire : réseau représentatif AZAY-mycobactéries
- Nombre de cas, prévalence dans l'espèce et taux d'incidence de la multirésistance : réseau exhaustif CNR-MyRMA
- Profil de résistance aux antituberculeux de 2ème ligne des souches résistantes et multirésistantes : étude phénotypique des souches reçues au CNR-MyRMA
- Place respective des différents mécanismes de résistance : étude génotypique des souches résistantes reçues au CNR-MyRMA



**Analyse moléculaire de la diffusion des souches de *M.tuberculosis***

- analyse cas groupés détectés par les enquêtes de terrain menées par les comités de lutte antituberculeuse (CLAT) ou les Equipes opérationnelles d'hygiène (EOH) des hôpitaux
- analyse systématique des souches multirésistantes

**Formes particulière de tuberculose**

- Méningite tuberculeuses à culture positive chez les enfants de moins de 5 ans, dans le cadre de l'évaluation des conséquences de l'arrêt de l'obligation vaccinale par le BCG : réseau exhaustif CNR-MyRMA
- Tuberculose à *M.bovis*, dans le cadre de l'impact sur l'homme de la tuberculose animale : réseau exhaustif CNR-MyRMA

**Conception d'un registre national pour le suivi des tuberculoses multirésistantes en France**

L'objectif est de suivre et documenter le devenir des patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants en France pour améliorer les missions de conseil en antibiothérapie lors des réunions du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » du CNR MyRMA. Ce projet a été initié fin 2012 avec le concours de la DGS (financement pour 1 an).

Nous avons rédigé un cahier des charges et un appel d'offre a été lancé fin 2013 pour la réalisation du logiciel informatique.

**Lèpre**

- Analyse des prélèvements de patients résidant en France et suspects de lèpre.
- Programme spécifique d'appuis au diagnostic bactériologique des cas de lèpre à Mayotte

**Activités d'information, formation, conseils**

- formations des stagiaires techniciens ou biologistes qui en feront la demande
- renforcements des conseils thérapeutiques par le « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile »
- comptabilisation et traçabilité des dossiers discutés en dehors des réunions du Groupe thérapeutique

**Travaux de recherche en lien avec l'activité du CNR-MyRMA**

- Compréhension des mécanismes de la résistance de *M. tuberculosis* aux fluoroquinolones
- Etude de l'activité in vivo des fluoroquinolones sur les souches présentant des mutations de l'ADN gyrase
- Etude structurale et fonctionnelle des ADN gyrase de *M.tuberculosis* et *M. leprae*
- Etude structurale de l'ATP synthase de *M.tuberculosis*
- Etude des mécanismes de résistance de *M. tuberculosis* au pyrazinamide
- Approche génomique des populations de *M.tuberculosis* complex
  - . Comparaison de l'efficacité des technologies de séquençage « génome entier »
  - . Etude de souches de *M. tuberculosis* Beijing MDR
- Mise au point d'un modèle murin pour évaluer l'activité des antilépreux dans la prévention du passage de l'infection à la maladie (traitements dits « prophylactiques »)



## 1. Missions et organisation du CNR-MyRMA

Pas de modification depuis l'année précédente

Voir la description détaillée en Annexe 1

## 2. Activités d'expertise

Voir la description des techniques disponibles en Annexe 2

### 2.1. Evolution des techniques en 2013

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

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

Nous avons appliqué la rep-PCR DiversiLab® d'une part sur 83 souches cliniques de la collection du CNR-MyRMA (43 *M. abscessus* subsp. *abscessus*, 12 *M. abscessus* subsp. *bolletii*, 28 *M. abscessus* subsp. *massiliense*), d'autre part sur 35 souches isolées de façon répétée sur une période d'un an, chez quatre patients atteints de mucoviscidose suivis à l'hôpital Necker Enfants Malades (32 *M. abscessus* subsp. *abscessus*, 3 *M. abscessus* subsp. *massiliense*). L'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le kit UltraClean microbial DNA et la rep-PCR en utilisant le kit d'empreinte (DiversiLab®) spécifique du genre *Mycobacterium*. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse capillaire à travers la puce LabChip Agilent. Les résultats ont été ensuite analysés sur le site Internet DiversiLab®.

Pour les souches de la collection du CNR-MyRMA, nous avons observé des profils électrophorétiques différents pour 53/83 (62%) souches. Ceci montre une grande diversité clonale de ces souches et un pouvoir discriminant de la technique supérieur à 98%. Néanmoins, 30 souches étaient regroupées en 6 profils non différenciables de 2 à 4 souches chacun. Les souches de même profil étaient isolées chez les patients atteints de mucoviscidose.

Les données de REP-PCR n'ont pas été totalement concordantes avec le typage par MLST, ce qui n'est pas étonnant puisque (i) les séquences génétiques étudiées sont différentes (insertion de séquences répétées REP dans tout le génome pour le Diversilab®, et étude de 7 gènes de ménage pour le MLST) et (ii) leur finalité est aussi différente (investigation d'épidémies pour le Diversilab® et étude phylogénétique pour le MLST).

Pour trois des quatre patients atteints de mucoviscidose suivis à Necker, les souches étaient non différenciables pour un même patient mais différente d'un patient à l'autre.

Enfin, les analyses de discrimination par sous espèce de *M. abscessus* nous ont montré que la REP-PCR Diversilab® ne distinguait pas les sous espèces entre elles (index de diversité de Simpson < 70%), c'est-à-dire ne pouvait pas identifier une souche comme *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* ou *M. abscessus* subsp. *abscessus*.



**En conclusion, la rep-PCR semi-automatisée apparaît fiable comme méthode de génotypage.** Elle a l'avantage d'être standardisée et rapide. Elle peut être utile pour déterminer la clonalité des souches au sein du complexe *M. abscessus* en cas d'épidémies ou pour l'investigation de cas liés à une source. Une étude approfondie des souches isolées de patients atteints de mucoviscidose et des réservoirs potentiels à leur contact paraît utile pour mesurer le risque de transmission ou d'acquisition chez ces patients à risque.

#### **Etude comparative de la détection des bacilles acido-alcoolo-résistants sur des lames colorées à l'Auramine FLUO-RAL dans le colorateur RAL STAINER par 2 protocoles de coloration**

L'objectif était de comparer 2 protocoles de coloration de BAAR à l'auramine dans le colorateur RAL-Stainer. Les deux protocoles (« long » et « court ») diffèrent par les temps des différentes étapes.

Les frottis ont été effectués en double à partir d'échantillons déjà étudiés par une technique de référence : 237 échantillons négatifs et 61 échantillons positifs à l'examen microscopique.

Parmi les lames positives, la répartition était comme suit :

<1 BAAR/champ et >10/lame = 19 prélèvements +

1 à 9 BAAR/champ = 10 prélèvements ++

10 à 99 BAAR/champ = 14 prélèvements +++

>100 BAAR/champ = 18 prélèvements ++++

Les lames ont été fixées 15mn sur une platine chauffante à température maximale (100°C) puis 15mn dans le fixateur RAL, en dehors du colorateur.

<b>Étapes</b>	<b>Protocole long</b>	<b>Protocole court</b>
Fixation	5 mn sans agitation	30 s
Rinçage	10 s avec agitation	30 s sans agitation
Auramine	15 mn sans agitation	10mn sans agitation
Rinçage	1 mn avec agitation	30 s sans agitation
Décoloration	1 mn sans agitation	30 s
Rinçage	10 s avec agitation	30 s sans agitation
Rouge thiazine	5 mn sans agitation	1mn sans agitation
Rinçage	30 s avec agitation	30 s avec agitation
Séchage	3 mn	2mn
<b>TOTAL</b>	<b>31 mn</b>	<b>16 mn</b>

Pour chaque coloration, il a été compté le nombre de résultats conformes, le nombre de résultats non-conformes (différent de celui attendu) et le nombre de non-conformités majeures (résultats attendu BAAR+ mais trouvés négatif). Les proportions de résultats non-conformes ont été comparées par le test exact de Fischer.

L'ensemble des 237 prélèvements à examen microscopique négatif attendu a été catégorisé comme négatif quel que soit le protocole de coloration.

Aucune non-conformité majeure n'était notée pour le protocole court contre 7 (11%) pour le protocole long (p=0,01).

Parmi les 19 prélèvements avec <1BAAR champ mais >10/lame, 17 (89%) étaient conformes par le protocole court contre 14 (74%) par le protocole long (p=0,4). Aucune non-conformité majeure n'était notée pour le protocole court contre 5 (26%) pour le protocole long (p=0,046).

Parmi les 10 prélèvements avec 1 à 9 BAAR/champ, tous étaient conformes par le protocole court contre 4 (40%) par le protocole long (p=0,01). Aucune non-conformité majeure n'était notée pour le protocole court contre 2 (20%) pour le protocole long (p=0,47).

Parmi les 14 prélèvements avec 10 à 99 BAAR/champ, tous étaient conformes par le protocole court contre 8 (57%) par le protocole long (p=0,02). Aucune non-conformité majeure n'était notée quelle que soit la coloration.

Parmi les 18 prélèvements avec >100 BAAR/champ, tous étaient conformes par le protocole court contre 8 (44%) par le protocole long (p=0,0003). Aucune non-conformité majeure n'était notée quelle que soit la coloration.

La proportion de non-conformités avec le protocole de coloration long était la même parmi les prélèvements positifs en culture à *M. tuberculosis* complex (16/33, 42%) ou à mycobactéries non tuberculeuses (8/19, 42%).



En conclusion, le protocole long a identifié significativement moins de prélèvements BAAR+ que le protocole court.

## 2.2. Activités d'expertise assurées par le CNR pour les laboratoires français en 2013

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

Au cours de l'année 2013 le CNR-MyRMA a reçu **1138 souches et prélèvements** pour identification et/ou typage moléculaire et/ou étude de la sensibilité aux antibiotiques (**Tableau 1**). Les souches et prélèvements proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et DOM-TOM (laboratoires hospitaliers, LABM...). a ce nombre il faut ajouter 45 biopsies pour recherche de *M.leprae*.

#### **Tendances évolutives 2007-2013**

Alors que le nombre total de souches et de prélèvements reçus a peu évolué depuis 2007 (1000 à 1200 par an), il y a eu une **augmentation importante du travail effectué sur le matériel reçu**.

Le nombre de souches de *M.tuberculosis* a augmenté de 33 % alors que le nombre de souches de mycobactéries atypiques a diminué de 10 % en raison de la volonté du CNR-MyRMA de se concentrer sur les souches responsables d'infection.

**L'évolution principale concerne l'augmentation du travail effectuée sur les souches de *M.tuberculosis*. Par rapport à la moyenne des années 2007 à 2011, on note :**

- **24% d'augmentation** du nombre de souches pour lesquelles un **antibiogramme de 1<sup>ère</sup> ligne** a été fait,
- **148% d'augmentation** du nombre de souches pour lesquelles un **antibiogramme de 2<sup>ème</sup> ligne** a été fait (+10% par rapport à 2012), ce qui demande beaucoup de travail par l'utilisation de nombreux milieux de culture spécifiques non commercialisés (qui doivent donc être préparés localement puis soumis à des contrôles de qualité) et de nombreux tests génotypiques,
- **57% d'augmentation** par rapport à la moyenne des années 2007-2010 du nombre de souches pour lesquelles un **génompage** a été fait (le chiffre de 2012, très élevé, était dû à un rattrapage des tests qui auraient dus être faits en 2011)

Par contre, le nombre d'antibiogrammes faits sur les mycobactéries atypiques (technique plus simple), a diminué.

### 2.2.2. Identification des souches reçues

**900 souches ont été soumises à identification** de l'espèce mycobactérienne et, pour la plupart ont été aussi soumises à un antibiogramme phénotypique et/ou à des tests génotypiques de détection de résistance et/ou à un génompage pour enquête épidémiologique : **492 souches du complexe *M. tuberculosis*** et **408 souches de mycobactéries atypiques**.



Tableau 1 : Activité du CNR- MyRMA de 2007 à 2012 : nombre de souches et prélèvements reçus, détail des études mises en œuvre

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>Total souches et prélèvements reçus (hors <i>M.leprae</i>)</b>	<b>1072</b>	<b>1100</b>	<b>1030</b>	<b>990</b>	<b>1206</b>	<b>1122</b>	<b>1138</b>
<b>Souches soumises à identifications<sup>a</sup></b>	<b>825</b>	<b>944</b>	<b>873</b>	<b>794</b>	<b>988</b>	<b>897</b>	<b>900</b>
<i>M. tuberculosis</i>	370	452	369	366	385	430	492
Mycob. atypiques	455	492	504	428	603	467	408
<b>Souches soumises à tests phénotypiques de sensibilité</b>	<b>432</b>	<b>442</b>	<b>470</b>	<b>468</b>	<b>551</b>	<b>542</b>	<b>464</b>
<i>M. tuberculosis</i> <sup>b</sup>	170	185	170	160	170	217	211
	(73)	(90)	(135)	(126)	(139)	(164)	(181)
Mycob. atypiques	262	227	300	308	381	325	253
<b>Souches soumises à génotypage<sup>c</sup></b>	<b>215</b>	<b>183</b>	<b>192</b>	<b>153</b>	<b>119</b>	<b>276</b>	<b>203</b>
<i>M. tuberculosis</i>	203	172	175	153	119	267	198
Mycob. atypiques	12	11	17	-	-	9	5
<b>Total prélèvements (hors <i>M.leprae</i>)</b>	<b>151</b>	<b>115</b>	<b>112</b>	<b>140</b>	<b>169</b>	<b>163</b>	<b>238</b>
<b>Biopsies <i>M.leprae</i><sup>d</sup></b>	<b>10 (2)</b>	<b>18 (7)</b>	<b>17 (7)</b>	<b>25 (7)</b>	<b>51 (22)</b>	<b>53 (24)</b>	<b>45 (25)</b>

a : une petite partie des souches reçues (<5%) sont déjà connues ou sont contaminées ou ne sont en fait pas des mycobactéries et n'apparaissent pas dans les autres rubriques du tableau

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

c : empreintes digitales génomiques (épidémiologie)

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

### Souches de *M. tuberculosis* complex

Parmi les **492 souches de *M.tuberculosis* complex** reçues en 2013, 277 (56%) ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce, soit lorsque leurs caractères phénotypiques s'écartaient de ceux typiques de l'espèce *M.tuberculosis* (ex. souches lisses, dysgoniques...), soit en tirant profit du génotypage qui, pratiqué depuis quelques années par la méthode des MIRU-24 loci, permet aussi de préciser l'espèce (cf. plus loin).

Parmi ces 277 souches, **240** étaient de l'espèce *M. tuberculosis*, qui reste l'espèce principale responsable de tuberculose humaine, **11** étaient de l'espèce *M. bovis* var *BCG* (nombre à peu près stable depuis 2007), **11 souches** étaient de l'espèce *M.bovis* (même ordre de grandeur que les années précédentes, suggérant qu'il n'y a pas d'émergence de tuberculose à bacille bovin) et **15 souches** étaient de l'espèce *M.africanum* (stable par rapport à 2007) (Tableau 2).



**Tableau 2 : Identification des souches de mycobactéries du complexe *M.tuberculosis* reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2013**

Espèces	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<i>M. tuberculosis</i> complex sans identification au sein du complexe	229	363	308	209	143	229	216
Identification au sein du complexe * :	141	89	61	157	242	201	277
<i>M. tuberculosis</i>	114	63	42	140	212	164	240
<i>M. bovis</i>	9	11	7	6	12	13	11
<i>M. africanum</i>	10	11	5	6	7	8	15
<i>M. bovis</i> var BCG	8	4	3	5	9	13	11
<i>M. caprae</i>			2				
<i>M. canettii</i>					1	3	
<i>M. microti</i>			2		1		
<b>Total <i>M. tuberculosis</i> complexe</b>	<b>370</b>	<b>452</b>	<b>369</b>	<b>366</b>	<b>385</b>	<b>430</b>	<b>493</b>

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

### Souches de mycobactéries atypiques

Parmi les 408 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2013, la répartition des principales espèces était la suivante (Tableau 3) :

- **182 souches (45% du total) du complexe *M. avium-intracellulare*** dont 99 *M.avium* et 66 *M.intracellulare*. et 17 *M. chimerea*. Parmi ces souches, (n=161 soit 88%), ont été considérées comme responsables d'infections.
- **48 souches de *M. xenopi*** (12% du total). Toutes étaient d'origine respiratoire sauf 1 (isolée d'un poignet). Parmi ces souches, 44 (92%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **18 souches de *M.kansasii*** (4% du total), agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose. Parmi ces souches, 15 (83%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **6 souches de *M.simiae*** ont été considérées comme responsables d'infection.
- **8 souches de *M.marinum***, agent classique d'infections cutanées après inoculation à partir d'aquariums ou d'animaux aquatiques. 2 souches issues d'une source potentielle d'un des cas Il n'y a pas eu en 2013 de cas groupés faisant craindre une exposition commune.
- **15 souches de *M.gordonae*** qui correspondaient toutes à des contaminations.
- **91 souches d'espèces à croissance rapide** (22% du total) réparties dans les espèces *M.chelonae*, *M. fortuitum*, *M.abscessus*, *M.bolletii*, *M.massiliense*, *M.peregrinum*, *M.mucogenicum* ou d'autres espèces rares. Au total, 70 des souches d'espèces à croissance rapide isolées chez des patients (77%) ont été considérées comme responsables d'infections, le plus souvent d'infections respiratoires dans le cadre de la mucoviscidose (*M.abscessus* complex) et d'infections cutanées (*M.chelonae*, *M. bolletii*) mais aussi des infections disséminées chez des immunodéprimés (*M. fortuitum*).

**Selon un autre point de vue, une partie des souches de mycobactéries atypiques reçues en 2013 (n=56 soit 14% environ) appartenaient à des espèces rares ou nouvellement décrites, comme suit :**

- 7 souches appartenaient au complexe *terrae* (dont 3 souches de *M.nonchromogenicum*, 1 souche de *M.kumamotoense* espèce décrite en 2006 et 2 souches de *M.arupense*, espèce décrite en 2006) dont 5 souches considérée comme responsable d'infection (2 infections cutanées, 2 ténosynovite et 1 respiratoire



- 3 souches de *M.lentiflavum* (mycobactérie proche de *M.simiae* et *M.genavense*, décrite en 1996), 1 considérée comme un contaminant, 1 isolée de prélèvement respiratoire et considérée comme responsable d'infection et 1 isolée d'une adénite cervicale d'un enfant de moins de 5 ans.
- 7 souches de *M.malmoense*, toutes considérées comme responsables d'infections : 6 respiratoire et 1 ganglionnaire cervicale chez un enfant de moins de 5 ans.
- 9 souches de *M.massiliense* (sous-espèce de *M. abscessus complex*, décrite en 2004) : 8 issues de prélèvements respiratoires et 1 de lésion cutanée post mésothérapie. 7 étaient responsables d'infections.
- 7 souches de *M.bolletii* (sous-espèce de *M.abscessus complex*, décrite en 2006) : 5 issues de prélèvements respiratoires et considérés comme responsables d'infections et 2 responsables d'infections cutanées.
- 2 souches de *M.mucogenicum* (espèce proche de *M.chelonae*, décrite en 1995) considérées comme des contaminants.
- 2 souches de *M.triplex* (espèce à croissance lente décrite en 1996) : 1 dans un prélèvement de calcinose sous-cutanée et 1 souche considérée comme responsable d'infection respiratoire.
- 1 souche de *M. celatum* (mycobactérie proche du complexe aviaire décrite en 1993) isolée d'une aspiration bronchique d'un patient immunodéprimé.
- 1 souche de *M. cookii* (mycobactérie à croissance lente décrite en 1990) considérée comme un contaminant.
- 2 souches de *M. shimoidaei* (mycobactérie proche de *M. xenopi*) considérées comme responsables d'infection : une respiratoire, une adénite cervicale chez un homme de 75 ans non immunodéprimé.
- 1 souche de *M.genavense* isolée de biopsie ganglionnaire (identification à partir d'ADN reçu) considérée comme responsable d'infection.
- 2 souches de *M.europaeum* (espèce à croissance lente décrite en 2011 proche de *M. simiae*) considérées comme responsable d'infection : une respiratoire et une d'arthrite chez un patient immunodéprimé.
- 1 souche de *M.gastri* (espèce proche de *M. kansasii*) considérée comme un contaminant (isolée d'un échantillon d'urine isolé)
- 4 souches de *M. szulgai* : 2 responsables d'infections pulmonaires chez 2 patients d'une même famille (le père et son fils) et ayant eu des antécédents d'infections par cette espèce en 2007 (1<sup>ère</sup> description en 1972) et 2 responsables d'infection pulmonaire chez deux patients présentant une pathologie pulmonaire sous-jacente.
- 4 souches de *M.parascrofulaceum* (1<sup>ère</sup> description en 2004, proche de *M. simiae*) : 3 isolées de prélèvements respiratoire d'un même patient et responsable d'infection et 1 responsable d'infection articulaire chez un patient immunodéprimé
- 1 souche de *M.novocastrense* (1<sup>ère</sup> description en 1997) isolée d'une expectoration et considéré comme contaminant.
- 4 souches de *M. peregrinum* (1<sup>ère</sup> description en 1962) dont 1 seule considérée comme responsable d'infection respiratoire.
- 2 souches de *M. smegmatis* considérées comme responsables d'infection.
- 1 souche de *M. haemophilum* (Mycobactérie de culture fastidieuse, 1<sup>ère</sup> description en 1978) isolée d'une hémoculture.

**Au total, 341 (84%) des 408 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2013 ont été considérées comme responsables d'infections. Ce pourcentage, élevé, est en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses efforts sur les souches importantes au plan médical.**

### **Tendances évolutives 2006-2013**

Le nombre de souches de mycobactéries atypiques reçues et considérées comme responsables d'infection a augmenté de 30% entre 2007 (n=262) et 2013 (n=341). Ceci est lié à la politique affichée du CNR-MyRMA de se concentrer sur les souches responsables d'infection.

La distribution entre les principales espèces de mycobactéries atypiques (*M.avium-intracellulare*, *M.xenopi*, *M.kansasii*, espèces à croissance rapide) est restée stable entre 2006 et 2013 (**Tableau 3**).



Tableau 3 : Identification des souches de mycobactéries atypiques reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2013 (classement par ordre dégressif, basé sur les chiffres de l'année 2009)

Espèce	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<i>M. avium</i>	85 (19%)	71 (14%)	105 (21%)	96 (22%)	116 (19%)	100 (21%)	99 (24%)
<i>M. intracellulare</i>	57 (13%)	77 (16%)	100 (20%)	82 (19%)	103 (17%)	105 (22%)	66 (16%)
<i>M. chimaera</i>							17 (4%)
<i>M. xenopi</i>	69 (15%)	66 (13%)	48 (10%)	52 (12%)	54 (9%)	49 (10%)	48 (12%)
<i>M. goodii</i>	35 (8%)	21 (4%)	33 (7%)	20 (5%)	23 (4%)	16 (3%)	15 (4%)
<i>M. chelonae</i>	37 (8%)	41 (8%)	31 (6%)	31 (7%)	44 (7%)	40 (9%)	11 (3%)
<i>M. kansasii</i>	28 (6%)	21 (4%)	31 (6%)	24 (6%)	26 (4%)	17 (3%)	18 (4%)
<i>M. abscessus</i>	37 (8%)	44 (9%)	24 (5%)	35 (8%)	54 (9%)	44 (9%)	40 (10%)
<i>M. bolletii</i>	3	5 (1%)	2	10 (2%)	10 (2%)	7	7 (2%)
<i>M. massiliense</i>	6 (1%)	13 (3%)	15 (3%)	9 (2%)	18 (3%)	12 (3%)	9 (2%)
<i>M. simiae</i>	6 (1%)	9 (2%)	19 (4%)	7 (2%)	11 (2%)	7 (1%)	6 (1%)
<i>M. fortuitum</i>	15 (3%)	18 (4%)	18 (4%)	11 (3%)	25 (4%)	21 (4%)	14 (3%)
<i>M. peregrinum</i>	20 (4%)	32 (7%)	16 (3%)	6 (1%)	12 (2%)	9 (2%)	3 (1%)
<i>M. interjectum</i>	4	1	6 (1%)	0	2		1
<i>M. mucogenicum</i>	2	6 (1%)	6 (1%)	8 (2%)	11 (2%)	2	2
<i>M. scrofulaceum</i>	3	5 (1%)	5 (1%)	4 (1%)	2		2
<i>M. szulgai</i>	3	3	3	3	8 (1%)	6	4 (1%)
<i>M. marinum</i>	6 (1%)	10 (2%)	2	2	3	4	8 (2%)
<i>M. arupense</i>	4	6 (1%)	2	2	5 (1%)	2	2
<i>M. genavense</i>		1	2	3	2	2	1
<i>M. haemophilum</i>			1	0	0		1
<i>M. malmoense</i>	3	8 (2%)	1	2	6 (1%)	1	7
<i>M. ulcerans</i>		1		1	0		
Autres espèces	32 (8%)	34 (7%)	34 (7%)	20 (5%)	56 (9%)	23 (5%)	27 (7%)
<b>Total</b>	<b>455</b>	<b>492</b>	<b>504</b>	<b>428</b>	<b>601</b>	<b>467</b>	<b>408</b>
<b>Responsables d'infections (N et %)**</b>	<b>262</b> 58%	<b>227</b> 46%	<b>300</b> 59%	<b>308</b> 72%	<b>381</b> 62%	<b>325</b> 70%	<b>341</b> 84%

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

Dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt en 2007 de l'obligation vaccinale par le BCG, 12 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2013 (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. malmoense*) ont été isolées d'adénites chez des enfants de moins de 5 ans. Le nombre de ces cas, qui avait nettement augmenté de 2006 à 2011, s'est stabilisé depuis 2012 (Tableau 4).



Tableau 4 : Evolution de 2006 à 2013 du nombre de souches de mycobactéries atypiques issues d'adénites cervicales chez des enfants âgés de moins de 5 ans

Année	N de cas
2006	3
2007	5
2008	7
2009	9
2010	11
2011	19
2012	12
2013	12

### 2.2.3. Identification à partir des prélèvements cliniques reçus

Parmi les prélèvements reçus au CNR-MyRMA en 2013 :

- 238 ont été mis en culture : 107 cultures étaient négatives, 9 contaminées et 122 positives à : *M.tuberculosis complex* (n=106), *M.xenopi* (n=4), *M.kansasii* (n=1), *M.avium complex* (n=3), *M.chelonae* (n=4), *M.lentiflavum* (n=1), *M.ulcerans* (n=1), *M.genavense* (n=2 identifications sur prélèvement).

- 25 ont fait l'objet d'un test d'amplification génique directe par PCR Taqman spécifique de l'ADN de *M.tuberculosis complex*. Les résultats étaient positifs :

- . pour 13 des 15 prélèvements à examen microscopique positif, les 2 négatifs correspondaient à deux cultures à *M. xenopi*.
- . pour 3 des 8 prélèvements à examen microscopique négatif mais à culture positive, les 5 autres étant négatifs en culture.
- . pour 1 des 2 prélèvements pour lesquels l'examen microscopique n'avait pas pu être fait en raison d'un trop faible volume.

### 2.2.4. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

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

**464 souches de mycobactéries ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques : 211 souches de *M.tuberculosis complex*** (dont 181, soit les 2/3, ont fait l'objet d'un antibiogramme de 1<sup>ère</sup> ligne et d'un antibiogramme de 2<sup>ème</sup> ligne) **et 253 souches de mycobactéries atypiques**. Ce dernier chiffre, en léger repli par rapport aux années précédentes, est due à la volonté du CNR de réduire le nombre d'antibiogrammes réalisés pour les mycobactéries atypiques isolées chez des patients sans antécédents de traitement et pour lesquelles le profil de sensibilité aux antibiotiques est bien connu (comme par exemple *M. avium complex*).

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

Les tests de sensibilité sur les **211 souches de *M.tuberculosis complex*** ont été :

- un antibiogramme « **standard** » (antituberculeux **de 1ère ligne**) pour **30 souches**, pour vérification des résultats trouvés dans les laboratoires d'origine.
- un antibiogramme « **complet** », (antituberculeux **de 1ère ligne et de 2<sup>ème</sup> ligne**) a été effectué **181 fois, sur 83**



souches envoyées pour multirésistance identifiée par le laboratoire expéditeur et 98 souches envoyées pour résistance à au moins l'isoniazide ou la rifampicine ou pour suspicion de multirésistance (résistance à l'isoniazide et crainte de résistance associée à la rifampicine) ou parce que les patients présentaient des intolérances médicamenteuses.

#### Résistance aux antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne des 211 souches testées en 2013 (Tableau 5)

- 32% (n=67) étaient sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine (**multisensibles**)
- 68% étaient **résistantes** à au moins un de ces 4 antibiotiques dont 56% (n=83) étaient **multirésistantes** (MDR) c'est-à-dire résistantes à l'isoniazide et la rifampicine.

Entre 2007 et 2013, la proportion de souches multisensibles parmi les souches reçues a diminué de 52 à 32%, ce qui reflète la volonté du CNR-MyRMA de se concentrer sur l'étude des souches résistantes et d'éviter de travailler sur des souches sensibles en dehors de demandes particulières (suspicion de résistance finalement non confirmée, intolérance aux antituberculeux de première ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats...). Inversement, la proportion de souches multirésistantes a augmenté de 22 à 39 % depuis 2007.

**Ce n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour tests de sensibilité que l'on peut établir des statistiques représentatives de la résistance aux antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne en France, mais à partir du travail en réseau spécifiquement organisé pour cela (réseau AZAY-mycobactéries, cf. section « Surveillance »).**

**Tableau 5 : Phénotype de résistance aux antituberculeux de première ligne des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2013**

		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>Sensible*</b>		<b>88 (52%)</b>	<b>86 (47%)</b>	<b>54 (32%)</b>	<b>59 (37%)</b>	<b>51 (30%)</b>	<b>62 (29%)</b>	<b>67 (32%)</b>
<b>Résistant</b>	H	7 (4%)	12 (6%)	21 (12%)	13 (8%)	21 (12%)	20 (9%)	19
à au moins	S	6	9	6	7	6	7	4
1 antibiotique	R	1	6	5	4	5	9	9
mais non	E	-	-	1	0	0	1	0
multirésistant	H+S	27 (16%)	17 (9%)	24 (14%)	23 (14%)	22 (13%)	14 (6%)	28
	H+E	-	-	2	1	0	0	1
	H+S+E	3	3	5	7	1	1	
	R+S						1	
	R+E						1	
	R+S+E	-	-	1	-	-	-	1
<b>Sous-total</b>		<b>44 (26%)</b>	<b>47 (25%)</b>	<b>65 (38%)</b>	<b>56 (35%)</b>	<b>55 (33%)</b>	<b>54 (25%)</b>	<b>61 (29%)</b>
<b>Multirésistant</b>	H+R	12	10	8	5	7	22 (10%)	13
	H+R+S	8 (5%)	20 (22%)	21 (12%)	12	16	21 (10%)	16
	H+R+E	E	'	3	2	6	7	8
	H+R+S+E	16 (9%)	18 (10%)	19 (11%)	26 (16%)	35	51 (24%)	46
<b>Sous-total</b>		<b>38 (22%)</b>	<b>52 (28%)</b>	<b>51 (30%)</b>	<b>45 (28%)</b>	<b>64 (37%)</b>	<b>101 (47%)</b>	<b>83 (39%)</b>
<b>TOTAL GENERAL</b>		<b>170</b>	<b>185</b>	<b>170</b>	<b>160</b>	<b>170</b>	<b>217</b>	<b>211</b>

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

**Résistance aux antituberculeux de seconde ligne des 181 souches testées en 2013 (Tableaux 6 et 7)****- Résultats pour les 83 souches multirésistantes (MDR) :**

Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient les suivantes (**Tableau 6**) : streptomycine 73%, éthambutol 66%, pyrazinamide 40%, éthionamide 73%, cyclosérine et PAS 24%, au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 41%, fluoroquinolones 30%.

La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **aussi** aux fluoroquinolones **et** à au moins un aminoside de réserve (définition de l'ultrarésistance ou **XDR**) était de **27%** soit **22 cas de tuberculose XDR identifiées en 2013** (cf. ci-après, **Tableau 10**).

**Tableau 6 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2013**

Années (n souches testées)	2006 (53)	2007 (38)	2008 (51)	2009 (51)	2010 (45)	2011 (64)	2012 (92)	2013 (83)
a Ethambutol	58	45	37	47	66	70	58	66
a Pyrazinamide								40
Streptomycine	75	76	76	78	75	80	70	73
b Amikacine	6	5	10	8	13	9	13	20*
b Kanamycine	15	5	16	16	20	23	27	41*
Capréomycine	9	8	10	10	12	11	14	23*
c Fluoroquinolones	13	8	14	18	23	22	28	30 <sup>\$</sup>
d Ethionamide	34	45	57	43	75	82	62	73
PAS	15	5	6	12	9	17	17	24
e Cyclosérine	10	11	37	20	9	18	28	24
Thiacétazone	42	30	26	39	52	39	62	69
Linezolid	0	0	0	0	0	0	1	0

a : antibiotiques de première ligne autres que isoniazide et rifampicine

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

c : entre dans la définition de XDR

d : ou prothionamide

e : antibiotiques bactériostatiques (de « dernière ligne »)

\* au total : 49 souches sensibles aux 3 aminosides ; 16 résistantes aux 3 ; 14 monorésistantes à kanamycine ; 1 résistante à kanamycine-amikacine ; 3 résistantes à kanamycine-capréomycine

\$ parmi les 25 souches résistantes à 2 mg/l d'ofloxacine (définition OMS de la résistance aux fluoroquinolones), 7 (28%) restaient sensible à 2 mg/l de moxifloxacine.

**- Résultats pour les 98 souches reçues pour antibiogramme complet dans un contexte autre que la multirésistance**

Les proportions de souches résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient beaucoup plus basses parmi les souches reçues dans un contexte autre que la multirésistance (ex. effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine) (**tableau 7**) que parmi les souches reçues pour multirésistance, ce qui est logique : 1-2% à l'amikacine ou aux fluoroquinolones, 5% à l'éthambutol.

L'observation d'une très faible proportion de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches non MDR est un



résultat rassurant car l'utilisation large de cette famille d'antibiotiques dans la communauté pour de nombreuses indications (infections urinaires, respiratoires etc...) fait craindre l'émergence de la résistance parmi les souches de *M.tuberculosis* complex sensibles aux antituberculeux de première ligne et donc à terme l'impossibilité d'utiliser cette classe pour les traitements antituberculeux de seconde ligne.

**Tableau 7 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> ligne des souches reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2012 pour antibiogramme de 2<sup>e</sup> ligne, hors multirésistance (suspicion initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1<sup>re</sup> ligne...)**

Années (n souches)	2006 (41)	2007 (35)	2008 (38)	2009 (83)	2010 (81)	2011 (75)	2012 (67)	2013 (98)
Ethambutol	nd	6	8	10	13	13	3	5
Streptomycine	nd	54	42	39	43	43	28	36
Amikacine	0	3	0	0	3	3	0	1
Fluoroquinolones	0	0	5	1	0	0	1	2
Ethionamide	14	21	29	52	59	59	66	40
PAS	6	11	10	10	11	11	3	8
Thiacétazone	9	12	10	14	11	11	16	16

**Tableau 8 : Evolution de 2001 à 2013 du nombre de souches MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA. Exhaustivité de l'envoi des souches MDR au CNR-MyRMA**

	Cas MDR recensés par le réseau CNR-MyRMA	Souches MDR reçues au CNR-MyRMA pour l'année	Exhaustivité envoi souches (%) pour l'année	Souches XDR reçues CNR-MyRMA	% XDR parmi MDR reçues CNR-MyRMA
2001	48	29	60	0	0
2002	79	47	59	1	2
2003	77	60	78	2	3
2004	68	51	75	1	2
2005	65	60	92	1	2
2006	60	53	88	2	4
2007	44	38	86	2	5
2008	57	51	89	2	4
2009	48	48	100	4	8
2010	47	45	96	6	13
2011	75	69	92	6	8
2012	94	92	98	17	18
2013	nd	83	nd	22	27

nd : enquête en cours, donnée disponible fin 2014

Le **Tableau 8** montre la stabilité du nombre de **souches MDR** de 2006 à 2010 (moyenne 43 cas/an), **l'augmentation** de 50% en 2011 (69 cas) puis de 30% en 2012 (92 cas) et une stabilisation en 2013 (83 cas).

Le **nombre de souches XDR** qui était de 1 ou 2 par an de 2006 à 2008 (idem depuis 2002) **a augmenté** à 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011 17 en 2012 et 22 en 2013. En conséquence, la proportion de XDR parmi les MDR a augmenté de 2-3% (2002 – 2005), à 4-5% (2006-07), 8% (2009), 13% (2010), 18% (2012) et 27% (2013).



**Tableau 9 : distribution des pays de naissance des cas de tuberculose MDR (souches 2006 à 2013)**

Pays d'origine	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
France	11	5	6	6	4	8	9	5
Allemagne								1
Norvège				1				
Portugal		2	2		2	1		
<b>Total Europe Ouest</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>6</b>
Roumanie	2	1	5	1		6	3	3
Bulgarie								1
Moldavie	1	1	1		1	1	1	
Féd. Russie hors Tchétchénie	2		1	2	1	7	6	2
Fédération Russie - Tchétchénie	1	1	5	3	4	4	8	3
Arménie	1	1	2	3		4	2	1
Azerbaïdjan					1			
Géorgie	2	1	1	4	1	5	26	32
Kosovo								1
Lituanie								2
Ukraine		2					4	2
<b>Total Europe Est et ex. URSS</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>50</b>	<b>47</b>
Algérie	1	3	2	1	1	3	1	2
Maroc		1		2		1	2	1
Tunisie						1	1	1
<b>Total Maghreb</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
Angola	1	1	1	1	2	1	1	1
Bénin							1	1
Cameroun		2	2		2			2
Cap-Vert					1			
Congo	3	1	4	4	1		3	
Côte Ivoire	5	1	2	3	2	2	1	1
Djibouti	1							
Egypte							1	
Erythrée								1
Ethiopie	1			1				
Ghana				1				
Guinée Conakry	3	1	2		2	1	1	2
Madagascar-Comores		1		1				1
Mali				1				
Mauritanie				1		1		
Niger			1					
Rep. Centrafricaine	1	1				1	2	1
RD Congo	4	5	1		2	5	5	4
Rwanda						1		
Sénégal	1		2	1	1		3	1
Soudan				1			1	
Tchad					1	1	1	
Togo	1							1
<b>Total Afrique hors Maghreb</b>	<b>21</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>19</b>	<b>16</b>
Bangladesh							1	
Cambodge			1					
Chine	1	1	1	2	1	1	3	1
Corée				2				
Inde	2			2		1	2	
Mongolie					2	1	1	
Népal	1							1
Pakistan			1	1	1	2	2	1
Sri Lanka		1						
Syrie				1				
Thaïlande						1		
Tibet		1			3			1
Turquie								1
Vietnam			1	2	2	1		2
<b>Total Asie</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>7</b>
Chili				1				
Haïti					1	1	1	
Equateur								1
Pérou	1	1			1			1
<b>Total Amériques</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Cas perdu de vue</b>								<b>1</b>
<b>GRAND TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>35</b>	<b>44</b>	<b>49</b>	<b>40</b>	<b>64</b>	<b>92</b>	<b>83</b>





Le **Tableau 9** montre que les nombres de souches MDR de patients nés en France, dans les autres pays d'Europe de l'Ouest, dans les pays du Maghreb, dans les pays d'Afrique hors Maghreb, dans les pays d'Asie et dans les pays d'Amérique sont restés stables

En revanche (**Tableau 9 et Figure 1**), il faut noter la **très forte augmentation du nombre de souches MDR de patients nés dans les pays d'ex-URSS et d'Europe de l'Est** entre la période 2006 – 2010 (n~10 /an), 2011 (n=27) puis 2012 (n=50), nombre qui semble se stabiliser en 2013 n=(47)

Le nombre de souches **MDR de patients nés en Géorgie est toujours en augmentation** en 2013 par rapport aux années précédentes : 1-4 /an en 2006-2010, 5 en 2011, 26 en 2012 et 32 en 2013.

la **Figure 1** montre bien l'**augmentation du nombre de souches XDR** et de la proportion des souches XDR parmi les souches MDR déjà vues plus haut. Le **Tableau 10** montre que les patients d'ex-URSS représentaient ¼ des cas de tuberculose XDR en 2004-2008, 2/3 des cas en 2009-2011, la totalité des cas en 2012 et 20/22 cas en 2013.

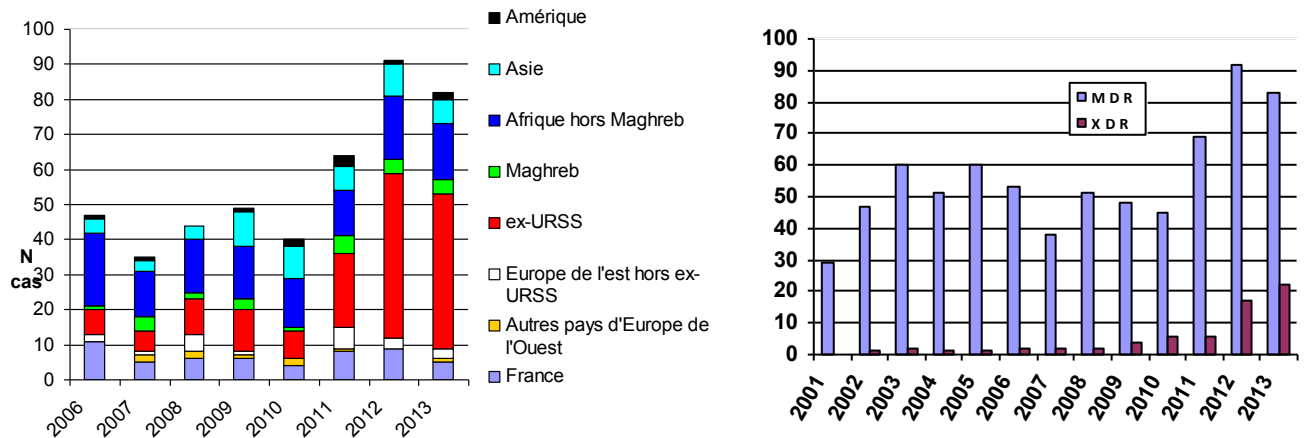
**Tableau 10 : Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyRMA de 2004 à 2013**

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique subsaharienne	Europe de l'Est et ex-URSS	Total
2004		1 (Algérie)			1
2005			1 (Mali)		1
2006	1 (France)			1 (Tchéchénie)	2
2007	1 (France)		1 (Congo)		2
2008				2 (Russie, Roumanie)	2
2009		1 (Algérie)		3 (2 Géorgie, Arménie)	4
2010	1 (Portugal)			5* (3 Tchéchénie, 1 Géorgie*, 1 Azerbaïdjan)	6*
2011	1 (Portugal)	2 (Algérie)	1 (Côte d'Ivoire)	2 (Russie)	6
2012				17 (15 Géorgie, 1 Arménie, 1 Ukraine)	17
2013	1 (France)			21 (19 Géorgie, 1 Ukraine, 1 Roumanie)	22

\* 1 cas déjà identifié en 2009, rechute

Enfin, il faut noter que parmi les cas de patients atteints de tuberculose MDR et nés en Géorgie (n=32) enregistrés en 2013, 59% (n=19) avaient une souche XDR, 16% (n=5) une souche pré-XDR alors que seulement 25% (n=8) avaient une souche MDR dite « simple » (sensible aux fluoroquinolones et aux aminosides de réserve).

La **Figure 1** montre l'évolution de la distribution des cas MDR-XDR selon le pays de naissance et du nombre de cas MDR (dont XDR) et des cas XDR.



Figures 1 : évolution (a) de la distribution des cas MDR-XDR selon le pays de naissance (à gauche) et (b) du nombre de cas MDR (dont XDR) et des cas XDR (à droite).

#### Tendances évolutives 2006-2013 (Tableaux 8 à 10, Figure 1)

Le nombre moyen de **souches MDR** reçues au CNR-MyRMA, qui était resté stable entre 2006 et 2010 **autour d'une médiane de 51 par an**, a **augmenté** en 2011 (n=69) et **en 2012 (n=92)** et **s'est stabilisé en 2013 (n=83)**. Cette stabilisation autour d'une centaine de souches par an semble maintenue au début d'année 2014.

Le nombre de **souches XDR**, qui était de **1 ou 2 par an de 2006 à 2008** (idem depuis 2002), a **augmenté à 4 en 2009**, **6 en 2010 et 2011**, **17 en 2012** et **22 en 2013**.

La **proportion de souches XDR parmi les souches MDR** a **augmenté de 2-3% pour la période 2002 - 2005**, **4-5% en 2006-07**, **8% en 2009**, **13% en 2010**, **18% en 2012** et **27% en 2013**.

Le nombre de **souches « pré-XDR »** (c'est-à-dire MDR résistantes aux fluoroquinolones **ou** à un des trois aminosides de réserve) a aussi augmenté de façon significative : **8 en moyenne par an de 2006 à 2010** mais **17 en 2011** et **21 en 2012** (10 résistants au moins à un aminoside et 11 résistants aux quinolones). Ce nombre s'est réduit en 2013 (n = 15 dont 12 résistants au moins à un aminoside et 3 résistants aux fluoroquinolones) alors que le nombre de souches XDR a augmenté d'autant.

Il faut remarquer que la proportion des souches MDR identifiées par l'enquête systématique auprès des laboratoires du réseau CNR-MyRMA (cf. section 3.1.2.) **et qui ont effectivement été reçues au CNR-MyRMA pour études *in vitro*** a augmenté entre les périodes 2001-02 (~ 60 %) et 2008-12 (90-100 %) (Tableau 8). **Le CNR-MyRMA reçoit donc la quasi-totalité des souches MDR de France.**

#### Tests phénotypiques de sensibilité des mycobactéries atypiques et tendances évolutives 2006-2013

**Au total 253 souches de mycobactéries atypiques ont fait l'objet de tests de sensibilité aux antibiotiques.**

Les résultats pour les **principales espèces** sont présentés ci-après :

***M.avium-intracellulare* complex** : parmi les 182 souches reçues en 2013, 103 (60 *M.avium* et 36 *M.intracellulare*, 7 *M.chimaera*) ont fait l'objet d'un antibiogramme dont 11 (11%) étaient résistantes à la



clarithromycine (CMI > 16 mg/l en milieu 7H9). Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement, 8/35 avaient une souche résistante soit **23% de résistance secondaire**.

Sur la période 2006 à 2013, la proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 8%, soit 90 souches sur les 1065 testées. Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement, 55/224 avaient une souche résistante soit **25% de résistance secondaire**.

***M.xenopi*** : parmi les 48 souches reçues en 2013, 32 ont fait l'objet d'un antibiogramme. Aucune n'était résistante à la clarithromycine. Seuls 4 patients avaient des antécédents de traitement. Entre 2006 et 2013, seules 2 souches de *M.xenopi* ont été trouvées résistantes à la clarithromycine parmi les 248 souches testées (1%). Ces souches ont été isolées chez 2 des 41 patients ayant des antécédents de traitement (**5% de résistance secondaire**).

***M.kansasii*** : Parmi les 18 souches reçues en 2013, 7 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante à la rifampicine y compris pour le seul patient ayant des antécédents de traitement. Entre 2006 et 2013, aucune des 164 souches reçues n'étaient résistantes à la rifampicine y compris pour les 16 patients ayant des antécédents de traitement (0 % de résistance secondaire).

**Espèces à croissance rapide** : Parmi les 7 souches de *M.chelonae* testées en 2013, une seule souche était résistante à la clarithromycine (avec mutation A2059C du gène *rrl*), elle a été isolée d'un patient avec antécédent de traitement.

En revanche, la proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 32/40 pour *M. abscessus* sensu stricto, 1/9 pour *M.massiliense*, et 7/7 pour *M.bolletii* (en cohérence avec la présence d'un gène *erm* spécifique conférant une résistance inductible chez cette dernière espèce). Les modifications des critères de classification de ces espèces durant la période 2006-2013 rend difficile la synthèse des résultats des tests de sensibilité pour le complexe *M.abscessus* (qui comprend *M.abscessus* sensu stricto, *M.bolletii* et *M.massiliense*).

Les 6 souches de *M.fortuitum* sur 8 souches testées étaient résistantes à la clarithromycine en accord avec la présence naturelle d'un gène *erm* conférant une résistance inductible aux macrolides chez cette espèce.

## **2.2.5. Détection de mutations impliquées dans la résistance acquise aux antibiotiques**

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

En 2013, ont été soumis à la détection moléculaire rapide de mutations impliquées dans la résistance :

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

- **58 souches de mycobactéries atypiques** pour différents antibiotiques antimycobactériens

- **25 souches de *M.leprae***

Aujourd'hui, le CNR-MyRMA analyse 12 gènes impliqués dans la résistance : *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *pncA*, *katG*, *inhA*, *rrs* (*rrs500*, *rrs900*, *rrs1400*), *rrl*, *embB*, *ethA*, *ethR*, *folP*, permettant d'étudier la sensibilité à 11 antibiotiques (rifampicine, fluoroquinolones, pyrazinamide, isoniazide, éthionamide, éthambutol, amikacine, kanamycine, capréomycine, macrolides, sulfamides).

### ***Tendances évolutives 2006-2013***

Le nombre de recherches de mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis*, qui avait doublé



entre 2006 et 2011 puis avait augmenté de 29 % de 2011 à 2012, est revenu en 2013 à un niveau équivalent à celui de 2011 (Tableau 11).

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

Tableau 11 : Nombre de recherches de mutations dans les gènes codant pour la résistance aux antituberculeux (rifampicine, isoniazide, pyrazinamide, fluoroquinolones, éthionamide, éthambutol, amikacine, kanamycine, capréomycine) effectuées au CNR-MyRMA sur les souches de *M.tuberculosis* complex reçues de 2006 à 2013

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<i>rpoB</i> (rifampicine)	184	197	276	254	201	232	284	267
<i>katG-inha</i> (isoniazide)	182	179	276	249	198	227	280	263
<i>pncA</i> (pyrazinamide)	142	138	172	164	137	183	217	211
<i>gyrA/gyrB</i> (Fluoroquinolones)	117*	105	150	129	128	183	231	215
<i>ethA/ethR</i> (éthionamide)	-	-	-	-	50	79	103	93
<i>rrs</i> (aminosides)	-	-	-	-	56	99	159	121
<i>emB</i> (éthambutol)	-	-	-	-	62	105	159	121
<b>Total</b>	<b>625</b>	<b>619</b>	<b>874</b>	<b>796</b>	<b>832</b>	<b>1109</b>	<b>1433</b>	<b>1291</b>

\* Dont 12 *gyrB*

### Rifampicine (RIF)

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBR*plus*® complété par l'amplification et le séquençage du gène *rpoB* ont permis d'identifier des **mutations dans *rpoB* pour 95 des 267 (36%)** tests réalisés en 2013 (Tableau 12).

La distribution des mutations étaient comme suit :

- **66 mutations S531L (69% des mutations)**
- 29 autres mutations (31% des mutations) réparties entre les codons 505 et 533 comme (tableau 12).

La **part dominante de la mutation S531L du gène *rpoB* dans la résistance à la rifampicine reste de l'ordre de 2/3 depuis 2006**, en accord avec les données publiées à l'étranger. En 2013, nous n'avons détecté aucune souche résistante à la rifampicine sans mutation détectée dans la région étudiée du gène *rpoB*, ce qui confirme que la recherche de mutations dans ce gène est une excellente approche rapide de détection de la résistance à la rifampicine et même de la multirésistance en raison de la rareté des souches monorésistantes à la rifampicine (cf. § surveillance de la résistance).



Tableau 12 : Distribution des mutations du gène *rpoB* identifiées dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2013 pour détection moléculaire de la résistance à la rifampicine (techniques : GenoType®MTB-DRplus, séquençage du gène *rpoB*)

Mutation dans RpoB	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
S531L	26	29	34	41	37	58	76	66
H526Y	2	2	5	7	4	6	3	1
H526D	3	3	2	5	4	6	6	
H526N ou T ou L ou S ou R ou C ou P	5	2		2	2	4	7	7
D516V	9	1	3	8	1	1	2	2
D516Y	4			2		3	2	4
Délétion N519				1		2		
L511P				1	3**			3
Q513P						1	2	
Q513K							1	
Q513E							1	1
L521V							1	
S531W	1			3		2	1	1
S531F						1	1	4
L533P	3			2	3	2	1	2
F505L + D516Y								1
S509T + S522W						1		
L511P + D516G						1	3	1
L511P + M515V							1	
L511P + H526N								1
S509T + D516Y						1		
Q510H + H526R						1		
L511R + D516Y						3		
S512I + H526N							1	
L511P + 1546-1547insT(516)							1	
D516G + L533P								1
Délétion sur 515-516						1		
Délétion à partir codon 523							1	
Insertion entre 531 et 532				6				
Mutation entre 510 et 533*		1	14	2				
Mutation entre 516 et 522°							3	
<b>Total avec mutation</b>	<b>53</b>	<b>38</b>	<b>58</b>	<b>80</b>	<b>54</b>	<b>94</b>	<b>114</b>	<b>95</b>
Pas de mutation	131	159	218	174	147	138	161	162
PCR négatives + ininterprétables <sup>a</sup>							9	10
<b>Total général</b>	<b>184</b>	<b>197</b>	<b>276</b>	<b>254</b>	<b>201</b>	<b>232</b>	<b>284</b>	<b>267</b>

\* position de la mutation non précisée

\*\* dont 1 avec en plus mutation S509I

° correspond au patient avec mutation L521V

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



## Isoniazide (INH)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBR*plus*, complété par le séquençage des gènes *katG*, *inhA* et du promoteur d'*inhA*, a permis d'identifier des **mutations dans *katG* et *inhA* pour 146 des 263 (55%) souches testées en 2013 (Tableau 13) :**

- **113 fois une mutations 315 dans *katG* (77%)**, toujours corrélée avec une résistance phénotypique à haut niveau à INH, dont 107 mutations isolées et 6 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA*. **La mutation S315T isolée était la plus fréquente (n=106, 73%)**

- 28 fois, une mutation de type « -15 c->t » dans la **région régulatrice du gène *inhA* (19%)**, corrélée, lorsqu'elle est isolée (n=22, 15%), avec une résistance phénotypique à bas niveau à INH.

**Tendances évolutives 2006-2013 : la part dominante de la mutation isolée S315T dans le gène *katG* reste de l'ordre de 2/3 depuis 2006**, en accord avec les données publiées à l'étranger. **Les mutations isolées de type « -15 c->t » dans la région régulatrice du gène *inhA* représentent environ 15% des cas. Les souches résistantes à l'isoniazide pour lesquelles on n'a pas détecté de mutation ni dans *katG* ni dans *inhA* et sa région régulatrice représentent 5 à 15 % de l'ensemble des souches testées selon les années.**

**Tableau 13 : Distribution des mutations des gènes *katG* et *inhA* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2013 pour détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide (techniques : GenoType®MTB-DR*plus* et séquençage des gènes *katG*, *inhA* et promoteur du gène *inhA*)**

Mutation	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
KatG S315T	73*	58*	54	73	49	76	101	106
KatG 315 autre que S>T	1*	2*	1	2	-	3	1	1
KatG autre que S315	7	6	9	14	7	12	10°	7
Promoteur <i>inhA</i>	12	27	17	28	24	21	13	22
<i>dont -15</i>	12	27	16	28	24	20	13°	22°
<i>InhA</i>	2	1		2	1**	2		4
KatG S315T <b>et</b> promoteur <i>inhA</i>	nd*	nd*	12	9	8	10	9	6
Autre combinaison KatG <b>et</b> <i>InhA</i>				1				
<b>Total mutations</b>	<b>95</b>	<b>94</b>	<b>93</b>	<b>129</b>	<b>89</b>	<b>124</b>	<b>132</b>	<b>146</b>
Pas de mutation	87	85	183	120	109	103	140	112
PCR négatives + ininterp. <sup>a</sup>							8	5
<b>Total général</b>	<b>182</b>	<b>179</b>	<b>276</b>	<b>249</b>	<b>198</b>	<b>227</b>	<b>280</b>	<b>263</b>

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

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

° dont 2 souches avec *KatG* A110V

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



## Pyrazinamide (PZA)

Le séquençage du gène *pncA* qui code pour la pyrazinamidase, enzyme qui transforme le PZA, prodrogue inactive, en acide pyrazinoïque, antibiotique actif, a été effectué **pour 211 souches en 2013** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).

Parmi 211 souches, 59 (28%) avaient une mutation du gène *pncA* (**Tableau 14**) dont 3 *M.bovis* (résistance naturelle par « mutation » H57D). Il faut noter la très grande diversité des mutations identifiées dans PncA, tant en nature qu'en position sur la protéine, diversité qui rend difficile l'interprétation de l'effet des mutations sur la résistance. Cette très grande diversité des mutations rend aussi très difficile de dresser un tableau évolutif sur plusieurs années car un tel tableau serait trop long.

**Tableau 14 : Distribution des mutations du gène *pncA* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA en 2012 et 2013 pour détection moléculaire de la résistance au pyrazinamide (technique : séquençage du gène *pncA*)**

Mutation	N 2012	N 2013
L4W ou S	1	4
I5T		1
I6L	1	1
V7A	1	1
V9A ou G	1	2
V9G	1	
Q10H	1	
G17C	1	
H43Y		1
T47P ou A		4
D49G ou A	1	1
H51R		1
H57D*	6	3
F58L	2	1
P62T		1
W68		1
H71R ou Y	2	4
L85R ou P	2	1
T87M	2	1
Y95STOP	1	
K96Q ou T	2	2
G97C	1	
A102V		1
Y103STOP	1	
S104R	2	
G108R	1	
L116R	2	
W119L ou C		2
L120R		1



V128G		1
G132D	1	
C138R		1
V139M ou A	2	3
Q141P		3
T142R ou M		3
A146T	1	
A146V	1	
L159R	3	
T160K		1
T167I	4	1
M175V ou T	1	2
P77L + V131G		1
Délétion dans pnca :	8	4
Insertion dans pnca :	5	5
<b>Total mutations</b>	<b>58</b>	<b>59</b>
<b>PCR négatives</b>	<b>3</b>	<b>7</b>
Pas de mutation	156	145
<b>Total général</b>	<b>217</b>	<b>211</b>

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

## Fluoroquinolones (FQ)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBR*sl*, complété par le séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour l'ADN gyrase, cible des fluoroquinolones, a été effectué **pour 215 souches reçues en 2013** (souches MDR, souches suspectes d'être MDR, par exemple, après rechute).

Des **mutations (Tableau 15)** ont été détectées chez **33 des 215 souches** (15%) dans **GyrA** (30 cas dont une double mutation GyrA et GyrB) ou **GyrB** (3 cas), incluant 22 souches MDR résistantes aux quinolones (dont 17 XDR et 1 pré-XDR), 4 souches sensibles aux quinolones mais qui portent un polymorphisme de *gyrA* ou *gyrB* ne conférant pas la résistance, et 2 souches sensibles aux quinolones et qui portent une mutation dans GyrB (R467P et G559A).

Les codons dominant dans GyrA étaient les codons 94 (n=14, 42%) et 90 (n=11, 33%).

**Tableau 15 : Distribution des mutations des gènes *gyrA* et *gyrB* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA de 2006 à 2013 pour détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones (technique : séquençage)**

Gène	Mutation*	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<i>gyrA</i>	T80A**		2	2	3	5	3	1	2
	G88C ou A		1						1
	D89N					1			
	A90V	2	1	2	2	3	3	7	11
	S91P				2	1	3		
	D94A			3		3	3	7	
	D94H			1	1		2		
	D94G	4***		3	1	2	1	8	12
	D94N	1			2		1	4	
	D94Y				1	1	3		1





## CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2013 (avril 2014)

	Q101E								1
	T80A** + A90G	3							2
	T80A** + A90E		1						
	A90V + D94Y								1
	A90V + D94V								3
	A90V + D94H								2
<b>gyrB</b>	S470I								1
	R467P**								1
	P478A**			1					1
	R485H		1						
	S486Y				1			1	
	D500A			1					
	D500N					1			1
	A506G				1				
	N538D				1				1
	N538K								1
	E540V				1			3	
	E540A					1			
	E540D								1
	A543V				1	1			
	A547V				1				
	G551R				1				
	G559A**		2				2	1	1
	R485C + A543V								1
<b>gyrA + gyrB</b>	D94A + A543V							1	1
<b>Total mutations</b>		<b>10</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	<b>33</b>
Pas de mutation		107	97	137	108	108	155	194	175
Résultats non interprétables <sup>a</sup>								6	7
<b>Total général</b>		<b>117</b>	<b>105</b>	<b>150</b>	<b>129</b>	<b>128</b>	<b>183</b>	<b>231</b>	<b>215</b>

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

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

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

#### Ethionamide

Le séquençage des gènes *ethA* et *ethR*, codant pour la monooxygénase EthA et son régulateur EthR, a été effectué pour 91 souches en 2013. Des mutations (Tableau 16) ont été détectées chez 46 souches (50%). On note une grande diversité des mutations dans EthA et, en 2013, l'absence de mutation dans EthR ou la région intergénique.



Tableau 16 : Distribution des mutations des gènes *ethA* et *ethR* dans les souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA en 2013 pour détection moléculaire de la résistance à l'éthionamide (technique : séquençage)

Gène	EthA EthR	2012	2013
<i>ethA</i>	G11D	1	1
	H22P	1	
	C27W		1
	G42V + P334A	1	
	F48S		1
	Y50C		1
	S55C		1
	G63D		1
	F66L + G199D	1	
	G78D + wt	1	
	R99G	1	
	Y140STOP	2	
	Y147STOP	1	
	Q165P	4	1
	H166P		1
	W167G	2	1
	Q206STOP	1	
	S208STOP	1	1
	Y211S		1
	V238G	1	1
	P257S		2
	R261W	1	
	S266R		3
	Q269STOP	2	2
	H281P		1
	I305N	1	
	I337V		1
	I338S		1
	T341I		1
	M372R		1
	N379D		1
	G385D	2	
	C403R	1	
	P422L		1
	L440P		1
	Q449R	1	
	D464G		1
	R483T	1	
	110 delA	5	
	505-511 del + I337V	1	



	Délétions	7	13
	Insertions	6	5
<b>ethR</b>	T149A	1	
<b>Zone intergénique</b>	-68 A->G	3	
	-66-65 ins CG	1	
<b>Total mutations</b>		<b>51</b>	<b>46</b>
Pas de mutation		49	42
PCR négatives <sup>a</sup>		3	3
<b>Total général</b>		<b>103</b>	<b>91</b>

\*Numérotation de *E.coli*

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

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

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBRs/® a été utilisé pour la recherche de mutations dans le gène *rrs* aux positions 1401, 1402 et 1484, ces 3 positions étant impliquées dans la résistance aux aminosides de seconde ligne (kanamycine et amikacine) et à la capréomycine. Au total, **121 souches ont été étudiées en 2013**. Les résultats montrent la présence d'une **mutation** a1401g pour 12 d'entre elles (10%), dont 11 sont MDR et la dernière non MDR mais résistante à kanamycine et amikacine. Comme attendu, aucune des 15 souches MDR monorésistantes à la kanamycine ne porte de mutation RRS.

#### **Ethambutol :**

Le système d'amplification-hybridation GenoType® MTBRs/ a également été utilisé pour la recherche de mutations dans le gène *embB* à la position 306 qui a été associée à la résistance à l'éthambutol. Au total, **121 souches ont été étudiées en 2013**, montrant la présence d'une **mutation** du codon EmbB-306 pour **33 d'entre elles** (27%) : M306V (n=22) et M306I (n=11). Une mutation au niveau du codon 497 (Q497R) a également été détectée par séquençage du gène *embB* à partir d'une souche résistante à l'éthambutol.

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

En 2013, 58 souches ont été soumises à la détection moléculaire rapide de la résistance :

- 51 à la clarithromycine par recherche de mutations de la région autour des nucléotides 2058 et 2059 du gène *rrl* codant l'ARN 23S. Trois de ces souches (6%) portaient une mutation : 2058 A>G (*M.intracellulare* n= 1), 2058 A>C (*M.intracellulare* n= 1), 2059 A>G (*M.intracellulare*, n= 1).

- 7 souches aux aminosides par recherche de mutation au niveau de la position 1400 du gène *rrs* codant l'ARNr16S. Une de ces 7 souches portait une mutation A1401G de l'ARNr16S.

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

En 2013, nous avons reçu 45 prélèvements pour diagnostic de lèpre (**Tableau 17**). Pour 25 prélèvements (55%), l'examen microscopique était positif. Ces prélèvements positifs correspondaient à 24 patients : 18 nouveaux cas et 6 rechutes, prélevés 13 fois chez des patients de Mayotte (13 nouveaux cas avec 14 prélèvements positifs), 4 fois chez des patients de Nouvelle Calédonie (1 nouveau cas, 3 rechutes), 1 fois de Guadeloupe (1 rechute) et 6 cas vus en consultation ou hospitalisés en France métropolitaine (1 cas à Paris-Pitié-Salpêtrière, 2 cas à Paris-Saint Louis, 1 cas à Rennes, 1 cas à Chambéry, 1 cas à Rouen) mais immigrants de pays ou régions où la



lèpre est encore présente (Pakistan, Brésil, Mayotte, Nouvelle Calédonie) ou y ayant longtemps résidé (Sénégal). Les tests moléculaires de résistance (amplification-séquençage des gènes *rpoB*, *folP* et *gyrA*) effectués sur les 25 biopsies cutanées positives ont été positifs pour 24 cas. Pour 1 biopsie, les amplifications étaient négatives du fait d'un faible nombre de bacilles ( $2 \times 10^2$ /ml).

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

- pour les nouveaux cas (recherche de résistance « primaire »), 17 souches ont été considérées comme sensibles (pas de mutation) à la rifampicine, aux sulfones et aux quinolones ; une souche a été considérée résistante aux quinolones (mutation A91V dans *gyrA*) mais comme sensible (à la rifampicine, aux sulfones. Il s'agit d'une patiente vue à la Pitié-Salpêtrière et originaire du Brésil.
- pour les cas de rechute, 4 souches étaient sensibles aux antilépreux (pas de résistance « secondaire »), 2 souches étaient résistantes à la dapsons (mutation T53I dans *folP* pour un cas de Nouvelle Calédonie et P55L pour un cas de Guadeloupe).

En 2013, nous avons eu 3 résultats positifs de culture in vivo (multiplication chez la souris nude au 7ème mois pour 2 souches et 11 mois pour une) pour les prélèvements reçus en 2012. Un antibiogramme secondaire est en cours pour deux des souches, les souris étant décédées avant le repiquage pour la 3ème souche.

**Tendance évolutive 2006-2013**

Le nombre de prélèvements pour suspicion de lèpre chez des patients vus en France (métropole ou DOM-TOM) reçus au CNR-MyRMA a beaucoup augmenté durant les 7 dernières années : 10 par an en 2006-07, 20 en moyenne en 2008-10, 50 en moyenne depuis 2011 (45 en 2013). Le nombre de cas confirmés a augmenté d'une moyenne de 3 à 7 entre 2006 et 2010 à 22 en 2011, 24 en 2012 et 25 en 2013. Au total, 8 des 90 cas positifs testés durant les 7 années étaient résistants aux sulfamides (dapsons) (9% de résistance), 2 aux quinolones et 1 à la rifampicine (**Tableau 18**).

**Tableau 17 : récapitulatif 2006-2013 des prélèvements reçus au CNR-MyRMA pour diagnostic de lèpre**

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>N total reçus</b>	10	10	18	17	25	51	51	45
<b>N prélèvements positifs pour <i>M.leprae</i> :</b>	5	2	7	6	7	22	24	25
<b>N cas de lèpre</b>								24
Nouveau cas	4	0	5	5	6	9	20	18
Rechutes	1	2	2	1	1	13	4	6
<b>Lieu du diagnostic</b>								
France Métropolitaine	0	0	2	2	4	10	8	6
DOM-TOM	5	2	5	4	3	12	16	18
<b>Pays d'origine des patients</b>								
DOM-TOM	5	2	5	2	5	14	16	20
Afrique			1	2	1	8	4	
Asie-Océan Indien			1		1		3	1
Amérique							1	1
Europe				2				1
<b>Resistance aux antilépreux</b>								
Dapsons	1/4	0/2	1/4	1/6	1/7	1/19	1/19	2/24
Rifampicine	0/5	0/2	0/4	0/6	0/7	1/19	0/19	0/24
Ofloxacin	0/3	0/2	0/3	1/6	0/7	0/19	0/19	1/24



## 3. Activités de surveillance

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

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

Les données recueillies en 2013 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2012 par les 39 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries qui couvre toutes les régions sauf la Corse. Ces 39 laboratoires de CHU ont colligé en 2012 les données concernant **1576 cas de tuberculose à culture positive**. Un test de sensibilité à au moins rifampicine et isoniazide a été réalisé pour 1558 des 1576 (99%) cas colligés. La distribution des cas par région est donnée dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M.tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie de 2006 à 2012 : distribution régionale des cas à culture positive. Pour 2012, les données sont exprimées en nombre de cas et en % du total des cas de l'année.

Régions	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
							N	%
Alsace	41	35	40	50	39	55	36	3,5
Aquitaine	144	116	106	126	132	141	111	8,9
Auvergne	0	29	23	29	18	21	17	1,3
Bourgogne	15	23	29	24	17	22	19	1,4
Bretagne	16	14	22	17	12	15	64	0,9
Centre	21	18	24	15	12	32	22	2,0
Champagne Ardennes	19	6	16	15	13	13	13	0,8
Corse	0	0	0	0	0	0	0	0
Franche-Comté	16	16	17	12	11	10	18	0,6
Ile de France	702	712	712	780	747	773	820	48,9
Languedoc-Roussillon	67	57	53	31	42	45	52	2,9
Limousin	16	13	23	14	14	22	13	1,4
Lorraine	25	28	36	28	23	33	22	2,1
Midi-Pyrénées	49	91	57	55	0	0	0	0
Nord-Pas de Calais	47	35	35	44	42	51	42	3,2
Normandie Basse	34	25	34	34	31	31	38	1,9
Normandie Haute	49	41	40	36	39	19	28	1,2
Provence ACA	0	37	39	38	61	44	40	2,8
Pays de Loire	69	74	79	63	71	85	74	5,4



Picardie	28	24	26	22	20	28	18	1,9
Poitou-Charentes	16	16	18	23	17	18	16	1,1
Rhône-Alpes	135	139	141	117	126	123	113	7,8
<b>TOTAL</b>	<b>1509</b>	<b>1549</b>	<b>3578</b>	<b>1574</b>	<b>1487</b>	<b>1581</b>	<b>1576</b>	<b>100</b>

Pour les 1558 cas pour lesquels la sensibilité à rifampicine et isoniazide a été éprouvée, les renseignements sur les antécédents de traitement ont permis de stratifier les données selon les recommandations de l'OMS (**Tableau 19**).

### Caractéristiques générales des cas de tuberculose recensés

La proportion des cas de tuberculose à culture positive étudiés par le réseau Azay-mycobactéries en 2012 en fonction des **antécédents de traitement (8,5% déjà traités)**, du **pays de naissance (63% nés à l'étranger)** et du **statut VIH (7,3%)** est présentée dans la **Figure 2**.

L'analyse de l'évolution depuis 1995 montre :

- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de la **proportion des cas diagnostiqués chez des patients ayant des antécédents de traitement** ce qui est en faveur d'une prise en charge convenable de la tuberculose en France (indicateur de qualité),
- une **augmentation de la proportion des cas diagnostiqués chez des patients nés à l'étranger**, de 35% environ au milieu des années 1990 à plus de 50% depuis 2002 et 63% en 2012. La plupart des pays d'Europe de l'Ouest (cf rapports OMS) constatent une évolution de ce type,
- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de la **proportion des cas diagnostiqués chez les patients VIH+** autour de 7-10 %, ce qui montre que la co-infection tuberculose-VIH est peu fréquente en France et que l'impact de l'épidémie du **VIH sur l'épidémiologie de la tuberculose est modeste**.

**Tableau 19 : Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2012 parmi les nouveaux cas de tuberculose (résistance "primaire") et les cas déjà traités (résistance "secondaire") selon le pays de naissance (France/autres pays). Réseau Azay-Mycobactéries**

Sensibilité	Nouveaux cas						Malades déjà traités					
	Total		France		Autres		Total		France		Autres	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Testées</b>	1254	100	432	100	796	100	131	100	42	100	88	100
<b>Sensible</b>	1127	89,9	394	91,2	709	89,1	90	68,7	39	92,9	51	57,9
<b>Résistant</b>	127	10,1	38	8,8	87	10,9	41	31,3	3	7,1	37	42,1
<b>- dont résistant au moins</b>												
SM	81	6,5	21	4,9	59	7,5	30	23,1	1	2,4	29	33,3
INH	82	6,5	25	5,8	56	7,0	33	25,2	1	2,4	31	35,2
RMP	29	2,3	5	1,2	23	2,9	28	21,4	0	0	28	31,8
EMB	17	1,4	3	0,7	14	1,8	21	16,2	1	2,4	20	23,0
<b>- dont monorésistant à :</b>												
SM	42	3,4	12	2,8	29	3,6	5	3,8	1	2,4	4	4,6
INH	30	2,4	12	2,8	18	2,3	4	3,1	1	2,4	2	2,3
RMP	2	0,2	0	-	2	0,3	1	0,8	0	-	1	1,1
EMB	1	0,1	1	0,2	0	-	1	0,8	1	2,4	0	-
<b>- dont MDR</b>	27	2,2	5	1,2	21	2,6	26	19,9	0	0	26	29,6

SM : streptomycine ; INH : isoniazide ; RMP : rifampicine ; EMB : éthambutol



Pour 18 souches, les antibiogrammes n'ont pas été réalisés  
Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 178 cas  
Le pays de naissance était inconnu pour 54 cas  
La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 16 cas

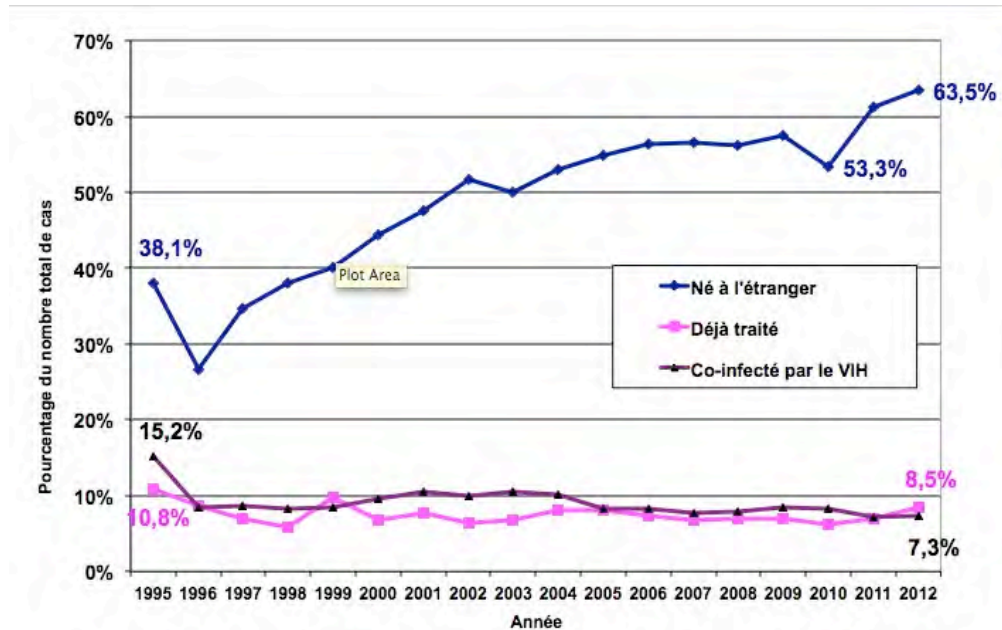


Figure 2 : Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2012

### Pourcentage global de résistance « primaire »

En 2012, chez l'ensemble des 1254 malades sans antécédent de traitement (nouveaux cas), le pourcentage de résistance ("résistance primaire") à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne était de 10,1% (Tableau 19, Figure 3). Ce chiffre est en légère augmentation depuis 1995 mais stable par rapport à celui de 2011.

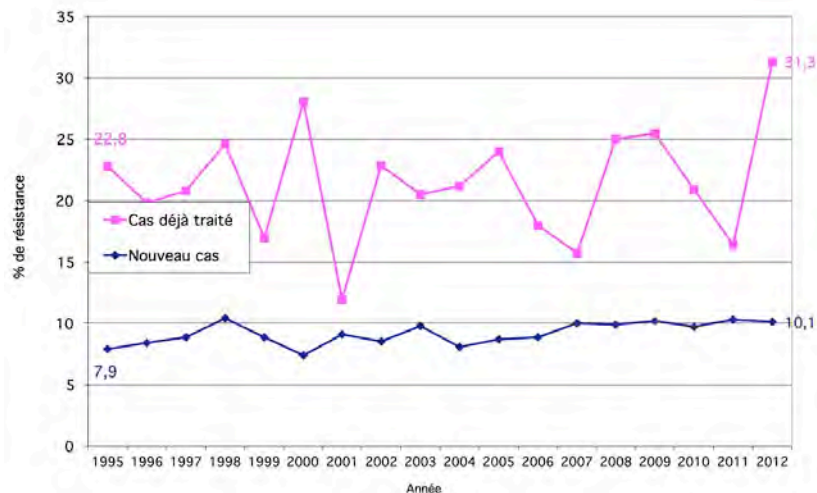


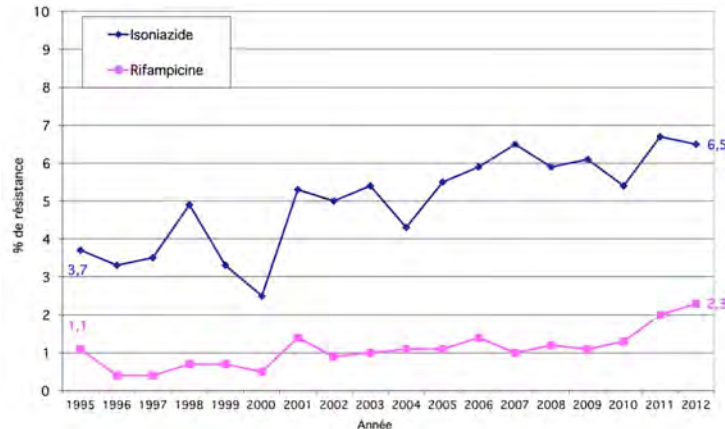
Figure 3 : Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide) de 1995 à 2012



### éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance primaire) et les cas déjà traités (résistance secondaire). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2012

Le pourcentage de résistance primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (**Figure 4, Tableau 19**) était beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 6,5%) et la streptomycine (SM 6,5%) que pour la rifampicine (RMP 2,3%) et l'éthambutol (EMB, 1,4%). **Le pourcentage de résistance primaire à l'INH en 2012 est sensiblement identique à celui de 2011 (6,7%) mais supérieur à celui de 2010 (5,4%),** et significativement plus élevé qu'au début de la surveillance (3,7% en 1995). Pour les détails de cette augmentation et la publication afférente, cf. le rapport 2012. **Ceci confirme l'importance de maintenir en France les recommandations thérapeutiques de quadrithérapie pour les nouveaux cas (c.a.d. incluant l'éthambutol).**

Comme les années précédentes, la quasi-totalité des souches résistantes à la rifampicine rapportées en 2012 chez les patients sans antécédent de traitement (27/29) étaient aussi résistantes à INH (multirésistante). La proportion de cas **multirésistants « primaires »** mesuré en 2012 au travers du réseau Azay-mycobactéries (2,2%) **est supérieure à celle de 2011, et le double de celles de 2010 (1,1%) et 2009 (1,0%).**



**Figure 4 : Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2012**

#### **Résistance primaire et pays de naissance**

Le pourcentage de résistance primaire à au moins un antituberculeux chez les 432 malades nés en France (**Tableau 19**) était de 8,8% alors qu'il était de 10,9% chez les 796 nés à l'étranger et donc, contrairement aux autres années, non significativement différent ( $p=0,28$ ). Ceci est principalement dû à la présence de 5 cas multirésistants nés en France. **Les pourcentages de résistance primaire à RMP restaient cependant plus élevés chez les 796 nés à l'étranger que chez ceux nés en France (2,9% vs 1,2% ;  $p=0,07$ ).**

#### **Pourcentage global de résistance « secondaire »**

Chez les 131 malades ayant déjà reçu un traitement antituberculeux, le pourcentage de résistance "secondaire" ou "acquise" à au moins un des 4 antituberculeux était de 31,3%, soit 3 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas (**Figure 5, Tableau 19**). Ce pourcentage est le plus élevé depuis le début de la surveillance en 1995, bien que les fluctuations enregistrées en limitent l'interprétation. Le pourcentage de résistance "secondaire" à INH observé en 2012 (25,2%) est aussi le plus haut depuis 1995 comme cela est le cas pour le pourcentage de résistance secondaire à RMP (21,4%) (**Figure 5**).

Ces augmentations importantes sont liées à l'augmentation du nombre de cas de tuberculose à bacilles MDR, 26 des 131 cas (19,9%) de tuberculose chez les malades ayant déjà reçu un traitement étant des cas MDR.





### Résistance secondaire et pays de naissance

L'ensemble des 26 cas de tuberculose à bacilles MDR « secondaire » ont été diagnostiqués chez des malades nés à l'étranger (Tableau 19). La résistance « secondaire » à chacun des quatre antituberculeux était faible chez les malades nés en France.

### Monorésistance à la rifampicine

En 2012, deux souches étaient monorésistantes à RMP chez les nouveaux cas (résistance « primaire ») et une souche chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Toutes ces souches monorésistantes RMP ont été isolées chez des malades nés à l'étranger.

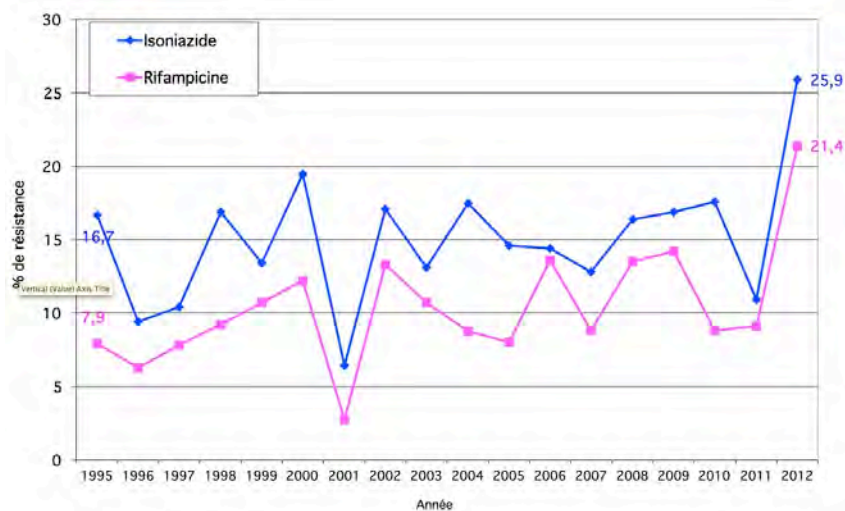


Figure 5 : Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2012

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

En 2013, le CNR-MyRMA a recueilli, à travers son réseau d'environ 260 laboratoires, des données concernant les cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2012. Comme chaque année, les données ne sont pas tout à fait complètes au moment de rédiger le rapport d'activité (88% de réponse au questionnaire). Les données colligées à ce jour **concernent 4038 cas de tuberculose à culture positive**.

**La région Ile-de-France a diagnostiqué près de la moitié des cas documentés de 2012 (47%) et la région Rhône-Alpes 12%**. Chacune des autres régions représentent de 0% (7 régions sans aucun cas) à 5% (4 régions avec 5 cas) du total des cas.

Comme les années précédentes, **la moitié des cas (50,2%) de tuberculose documentés en 2012 était concentrée dans les 20 laboratoires dont l'activité est la plus importante (Figure 6):**

- 14 laboratoires de CHU (8 d'Ile de France et 6 d'autres régions), un ne participant pas au réseau AZAY-Mycobactéries
- 4 hôpitaux généraux d'Ile-de-France
- 2 gros laboratoires privés



Malgré la place prépondérante de gros laboratoires, un petit nombre de cas MDR sont identifiés chaque année dans des laboratoires diagnostiquant peu de cas de tuberculose (Figure 7) ce qui justifie le gros travail d'exhaustivité mené par le CNR-MyRMA pour intégrer dans le réseau tous les laboratoires du territoire national qui pratiquent la mycobactériologie.

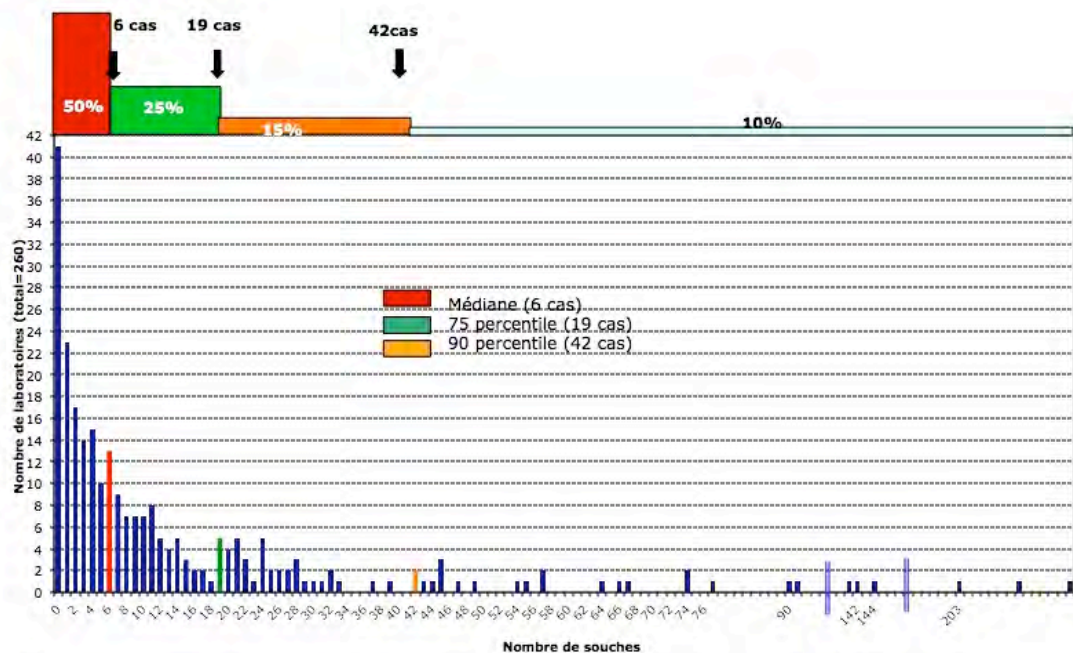


Figure 6 : Distribution des laboratoires du réseau du CNR-MyRMA en fonction du nombre de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2012

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

Le nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en France par les 230/260 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour était de 94 en 2012, ce qui représente 2,3 % (IC 1,9%-2,8%) des 4038 cas colligés (Tableau 20).

Nous n'avons pas pu obtenir de précision sur le seul cas diagnostiqué dans les DOM. Parmi les 93 cas de métropole, 2 (2,2%) concernaient des patients déjà identifiés les années précédentes (cas à rechutes) et 91 des patients identifiés pour la 1<sup>ère</sup> fois en 2012.

Le pourcentage de cas MDR (2,3%) calculé sur les 4038 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par l'ensemble des laboratoires français qui pratiquent la mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) est significativement ( $p < 0,01$ ) inférieur à celui calculé sur les 1558 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les 39 laboratoires universitaires du réseau Azay-Mycobactéries (3,7% en cumulant les cas de résistance 1aire, 2aire et les cas avec antécédents inconnus ou douteux). Cette différence peut être expliquée par le caractère spécialisé des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU et justifie le recours à 2 réseaux complémentaires.

Comme chaque année, quelques laboratoires du réseau CNR-MyRMA n'ont pas encore adressé les données 2012 malgré de nombreuses relances ; toutefois, il est peu probable que le nombre total de cas multirésistants diagnostiqués en France en 2012 augmente avec les réponses de ces derniers laboratoires car tous les cas correspondants aux souches MDR reçues par le CNR-MyRMA pour confirmation et antibiogramme complémentaire (cf. plus haut « activités d'expertise ») ont déjà été inclus dans l'analyse. La proportion définitive des cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2012 devrait être en revanche très légèrement inférieure à 2,3% après intégration au dénominateur (total des cas de tuberculose à culture positive) des données des derniers laboratoires qui ne concerneront très probablement que des cas de



tuberculose non MDR.

Calculée pour chacune des régions de France (**Tableau 20**), la proportion de cas multirésistants rapportée au total des cas de tuberculose bactériologiquement prouvés était en 2011 comprise entre 0 et 10,2%.

**Tableau 20 : Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2012 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA**

Région	Total cas	Cas MDR	
		N	%
Alsace	72	4	5,5
Aquitaine	157	2	1,3
Auvergne	20	0	0
Bourgogne	32	0	0
Bretagne	161	5	3,1
Centre	79	3	3,8
Champagne Ardennes	43	0	0
Corse	4	0	0
Franche-Comté	44	2	4,5
Ile de France	1894	40	2,1
Languedoc-Roussillon	100	4	4,0
Limousin	20	0	0
Lorraine	58	1	1,7
Midi-Pyrénées	51	1	2,0
Nord-Pas de Calais	143	5	3,5
Normandie Basse	59	0	0
Normandie Haute	63	0	0
Provence ACA	221	5	2,3
Pays de Loire	119	3	2,5
Picardie	40	2	5,0
Poitou-Charentes	49	5	10,2
Rhône-Alpes	501	11	2,2
Départements d'outre-mer	108	1	0,9
<b>Total</b>	<b>4038</b>	<b>94</b>	<b>2,3</b>

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

**Les caractéristiques des 91 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2012 en métropole sont les suivantes :**

- 73% sont des hommes
- 10 (11%) sont nés en France, et 81 (89%) à l'étranger,
- parmi les 81 nés à l'étranger, 51 sont nés en Europe de l'Est (dont 28 en Géorgie), 18 en Afrique sub-saharienne, 6 au Maghreb, 5 en Asie, et 1 à Haïti
- l'âge médian est de 32 ans (3 cas de moins de 5 ans, 3 cas de plus de 60 ans, 20% de 15 à 24 ans et 33% de



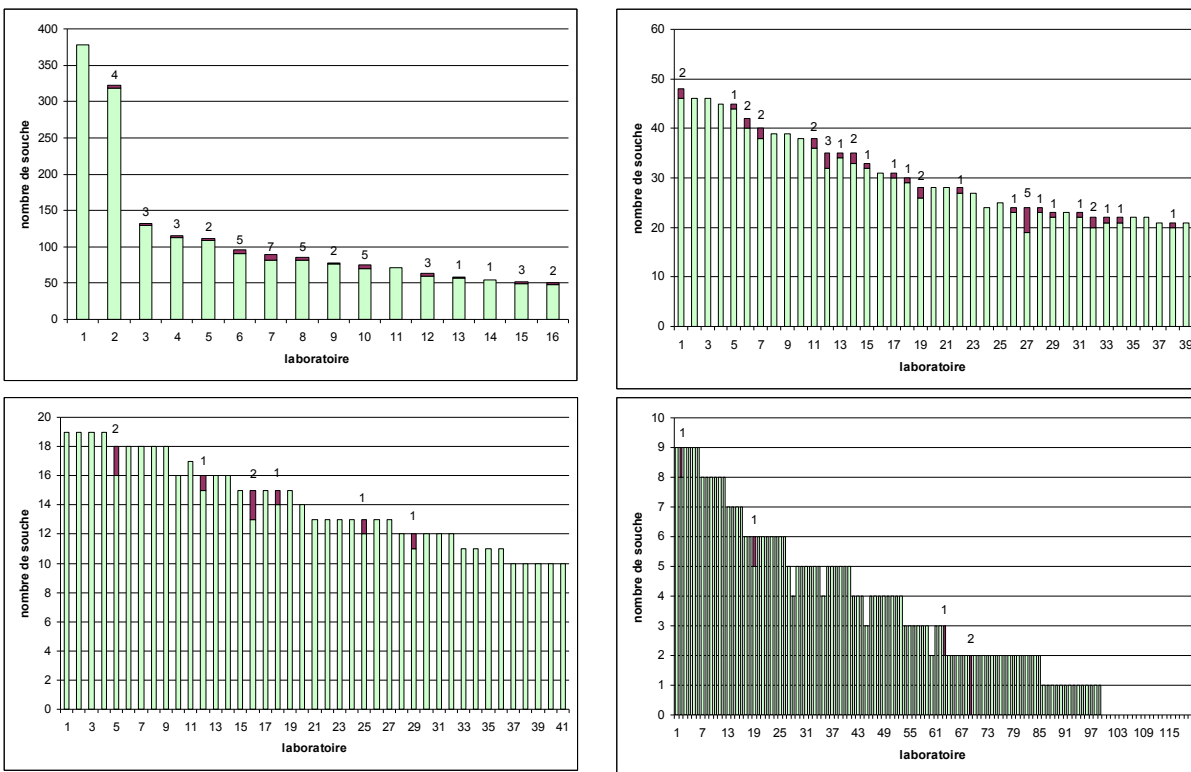
25 à 34 ans),

- 5% sont séropositifs pour le VIH, 92% sont séronégatifs et 3% de statut VIH inconnu
- 86% des cas ont une atteinte pulmonaire de leur tuberculose,
- 51% n'ont jamais été traités (MDR « primaire »),

### Laboratoires ayant identifié les cas de tuberculose MDR de 2012

La **Figure 7** montre que les cas de tuberculose à bacilles multirésistants identifiés en 2012 sont dispersés dans de très nombreux laboratoires, 46 au total pour 94 cas, même dans des laboratoires qui diagnostiquent peu de cas de tuberculose, **ce qui impose d'inclure tous les laboratoires qui pratiquent la mycobactériologie pour pouvoir assurer une surveillance exhaustive des cas MDR**. Le nombre de cas MDR diagnostiqués par ces 46 laboratoires est compris entre 1 et 7 cas (moyenne 2 cas).

Les 17 laboratoires qui ont diagnostiqué au moins 50 cas de tuberculose en 2012 (total = 1843 cas, soit 46 % des cas de l'année) ont identifié 46 cas MDR (soit 49 % des cas MDR de l'année) mais 35 cas MDR ont été diagnostiqués dans les 39 laboratoires ayant diagnostiqué entre 20 et 49 cas de tuberculose et 13 cas MDR dans 162 laboratoires ayant diagnostiqué moins de 20 cas, dont 5 par les 120 laboratoires ayant diagnostiqué moins de 10 cas.



**Figure 7 : Distribution des cas de tuberculose MDR diagnostiqués en 2012 selon le nombre total de cas de tuberculose diagnostiqués dans les laboratoires.**

de haut en bas et de gauche à droite : les 17 laboratoires ayant diagnostiqué  $\geq 50$  cas (totalisent 46 cas MDR), les 39 laboratoires ayant diagnostiqué de 20 à 49 cas (totalisent 35 cas MDR), les 42 laboratoires ayant diagnostiqué de 10 à 19 cas (totalisent 8 cas MDR) et les 120 laboratoires ayant diagnostiqué  $< 10$  cas (totalisent 5 cas MDR)

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



## Tendances évolutives 1992-2012

Le nombre de cas multirésistants de 2012 est bien supérieur à celui de 2011 et de 2010 et est le plus élevé depuis le début de la surveillance en 1992. Durant les 19 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau 21), le pourcentage de cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en France a augmenté de 0,4-0,7% durant la période 1993-1998 à 0,9% en 1999-2001, à 1,1-1,4 % en 2002-2010 puis finalement 1,7% en 2011 et 2,3% en 2012.

Tableau 21 : Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2012)

Année	Cas MDR	Total cas	% MDR	[IC95]
1992	48	8441	0,6	[0,4-0,7]
1993	40	8539	0,5	[0,3-0,6]
1994	58	7751	0,7	[0,5-0,9]
1995	40	7119	0,6	[0,4-0,8]
1996	29	6441	0,5	[0,3-0,6]
1997	26	5917	0,4	[0,3-0,6]
1998	39	5766	0,7	[0,5-0,9]
1999	48	5597	0,9	[0,6-1,1]
2000	51	5569	0,9	[0,7-1,2]
2001	48	5445	0,9	[0,7-1,2]
2002	79	5609	1,4	[1,1-1,7]
2003	77	5480	1,4	[1,1-1,8]
2004	68	5333	1,3	[1,0-1,6]
2005	65	5043	1,3	[1,0-1,6]
2006	61	4933	1,2	[0,9-1,5]
2007	44	4802	0,9	[0,7-1,2]
2008	57	4880	1,2	[0,9-1,5]
2009	48	4503	1,1	[0,8-1,4]
2010	47	4388	1,1	[0,8-1,4]
2011	75	4383	1,7	[1,3-2,1]
2012*	94	4038	2,3	[1,9,-2,8]

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

La distribution régionale des cas MDR identifiés par le CNR-MyRMA est restée remarquablement constante durant les années 2006-2012 (Tableau 22) pour la majorité des régions. Les exceptions sont la région **Rhône Alpes** où le nombre annuel de cas est passé de 5-6 entre 2006-2010 à 14 en 2011 et 11 en 2012, la région **Provence-Côte d'azur** où le nombre annuel de cas est passé de 1-4 entre 2006-2010 à 9 en 2011 mais 5 en 2012, et les régions **Bretagne et Poitou-Charentes** où le nombre annuel de cas est passé de 0-3 entre 2006-2011 à 5 en 2012. En Ile-de-France, le nombre annuel de cas qui était autour de 30 avant 2011 est passé à 36 en 2011 et 40 en 2012.

L'Ile-de-France cumule la moitié (52%) du total des cas MDR enregistrés de 2006 à 2012 (Figure 9).

Tableau 22 : Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2006 à 2012 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA



Région	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	TOTAL	% total
Alsace	2	0	2	1	2	3	4	14	3,3
Aquitaine	3	0	1	1	1	0	2	8	1,9
Auvergne	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Bourgogne	0	0	0	0	1	1	0	2	0,5
Bretagne	1	1	2	3	0	2	5	14	3,3
Centre	0	0	1	0	0	1	3	5	1,2
Cham. Ardennes	1	0	0	0	0	0	0	1	0,2
Corse	0	0	3	2	1	0	0	6	1,4
Franche-Comté	0	0	0	0	0	0	2	2	0,5
Ile de France	35	28	31	30	23	36	40	223	52,5
Languedoc-Roussillon	0	1	2	0	2	2	4	11	2,6
Limousin	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Lorraine	2	2	0	0	0	1	1	6	1,4
Midi-Pyrénées	0	1	0	1	0	0	1	3	0,7
Nord-Pas de Calais	2	1	1	1	1	1	5	12	2,8
Normandie Basse	0	1	0	0	3	1	0	5	1,2
Normandie Haute	2	3	0	0	1	1	0	7	1,6
Provence ACA	4	1	2	1	4	9	5	26	6,1
Pays de Loire	2	0	2	2	0	2	3	11	2,6
Picardie	0	0	1	0	1	0	2	4	0,9
Poitou-Charentes	1	0	1	1	0	0	5	8	1,9
Rhône-Alpes	3	5	7	5	5	14	11	50	11,8
Dép. d'outre-mer	2	0	1	0	2	1	1	7	1,6
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>44</b>	<b>57</b>	<b>48</b>	<b>47</b>	<b>75</b>	<b>94</b>	<b>425</b>	<b>100</b>

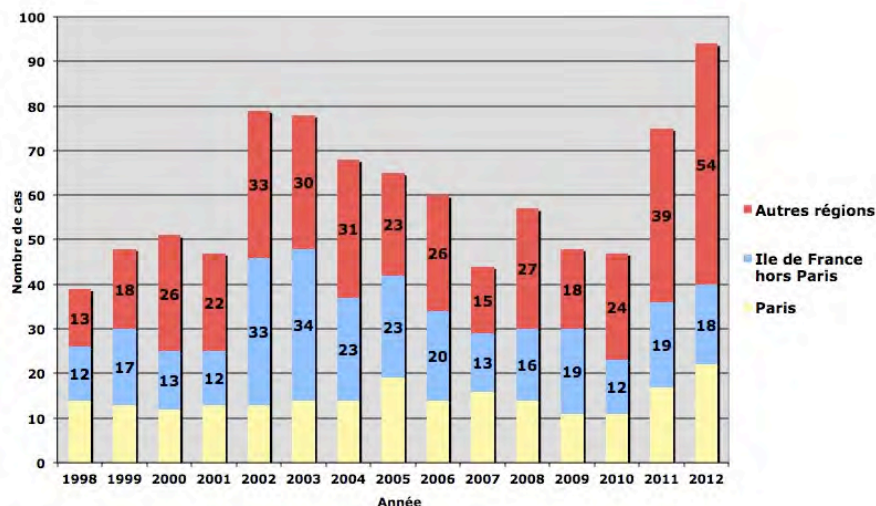


Figure 9 : Evolution de la distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants selon la région du laboratoire signalant le cas : Paris, Ile de France, autres régions, 1998-2012



Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont beaucoup modifiées durant les 19 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (**Tableau 23**). En effet, il faut noter une **diminution constante** des proportions représentées par les **hommes** (74 à 58%), par les patients avec **antécédents de traitement** (73% à 37%), et par les patients **nés en France** (47% à 10%).

L'augmentation de la proportion de patients nés à l'étranger (de 53% à 90%) concerne ceux nés en Europe (Europe de l'est et ex-URSS) et en Afrique sub-saharienne.

En 2012 il y avait par rapport aux cinq dernières années une très grande majorité de cas de sexe masculin et plus de cas nés en Europe et sans antécédents de traitement.

**Tableau 23 : Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 2006 à 2012**

Caractéristiques	Période				
	1992-1996	1997-2001	2002-2006	2007-2011	2012
N total de cas recensés, dont :	215	211	351	275	94
- déjà connus CNR-MyRMA*	43 (20%)	38 (18%)	40 (11%)	19 (7%)	2 (2%)
- recensés pour la 1 <sup>ère</sup> fois	172 (80%)	173 (82%)	311 (89%)	254 (92%)	91 (97%)
<b>Parmi les cas signalés pour la 1<sup>ère</sup> fois :</b>					
Age médian	39 (16-88)	36 (3-85)	31 (0-95)	32 (0-82)	32 (0-62)
Sexe masculin	74%	65%	60%	58%	73%
Antécédents de traitement	73%	47%	38%	37%	48%
Atteinte pulmonaire	92%	91%	90%	84%	86%
Né à l'étranger, dont:	53%	69%	82%	90%	89%
- Europe	6%	8%	15%	30%	56%
- Maghreb	16%	21%	13%	7%	7%
- Afrique Sub-saharienne	17%	25%	39%	28%	20%
- Autres	14%	14%	15%	15%	6%
Examen microscopique (+)	58%	61%	62%	48%	53%
Résistance à l'éthambutol	33%	30%	35%	53%	58%
Résistance à streptomycine	54%	58%	63%	71%	72%

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

### **3.1.3. Etude de la prise en charge et le suivi des tuberculoses multirésistantes en France, projet de registre des cas MDR-XDR**

L'objectif est de suivre et documenter le devenir des personnes atteintes de tuberculose à bacilles multirésistants (TB MDR) en France pour améliorer les missions de conseil en antibiothérapie lors des réunions du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » du CNR MyRMA. Ce projet a été initié fin 2012 avec le concours de la DGS (financement pour 1 an, 2012-13).

Il s'agit d'enregistrer les modalités de prise en charge, de réunir les informations cliniques, bactériologiques, génomiques recensées jusqu'à l'issue de leur traitement et enfin les informations sur le devenir des patients durant deux ans après le début du traitement. L'étude s'efforce d'intégrer la cohorte de patients déjà prise en charge par le biais des réunions du Groupe thérapeutique. Pour cela, il faut développer un système de gestion de l'information des dossiers de chaque cas de TB MDR, robuste, simple et confidentiel adapté à l'enregistrement et au suivi des données cliniques, biologiques, thérapeutiques, incluant la tolérance aux traitements des tuberculoses MDR en France. Un accès selon différents niveaux de droits permettra une utilisation sécurisée en ligne par différents utilisateurs (coordination de l'étude, conseil en antibiothérapie, responsables des soins, laboratoire, enquêteurs épidémiologiques).

Nous avons rédigé un cahier des charges avec un étudiant en thèse rémunéré sur la subvention de la DGS, les médecins du groupe de thérapeutique et après un travail d'analyse des dossiers de cas MDR pris en charge au



centre médical de Bligny.

L'appel d'offre a été lancé fin 2013 pour la réalisation du logiciel informatique. A ce jour un industriel a répondu positivement.

### **3.1.4. Surveillance de la tuberculose à *Mycobacterium bovis***

Le CNR-MyRMA a recensé en 2012 les cas de tuberculose à *M.bovis* à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des laboratoires de CHU. Ce réseau dispose également des données pour l'année 2011 ; toutefois, pour cette dernière année, les laboratoires n'ont pas contrôlé rétrospectivement que l'information était bien saisie dans la base de données, ce qui peut influencer à la baisse sur le nombre de cas. Il faut noter de plus que quelques laboratoires du réseau n'identifient pas les mycobactéries jusqu'à l'espèce mais s'arrêtent à *M. tuberculosis* complex. Ceci explique que le dénominateur de la surveillance de *M. bovis* est légèrement inférieur à celui de la surveillance de la résistance aux antituberculeux. Finalement, les chiffres sont donnés en excluant « *M. bovis* BCG » (souches vaccinales).

**Les infections à *M. bovis* représentaient moins de 2% des cas de tuberculose humaine en 2011 et 2012 (Tableau 24)**

**Tableau 24. Nombre et pourcentage de tuberculose à *Mycobacterium bovis* en France (réseau AZAY-Mycobactéries)**

Année	2011	2012
Nombre de cas de <i>M. bovis</i>	19	28
Nombre total de tuberculose culture +	1546	1530
Pourcentage de <i>M. bovis</i>	1,23%	1,83%
N laboratoires inclus dans la surveillance	35	37

Parmi l'ensemble des cas de tuberculose à *M. bovis* des deux années, 45% cas étaient des hommes alors que cette proportion était de 65% ( $p<0,01$ ) pour les autres cas de tuberculose. Parmi les cas de tuberculose à *M. bovis*, 14 (30%) étaient nés en France, 26 (55%) au Maghreb, 2 (4,5%) en Afrique sub-saharienne, 2 (4,5%) en Europe et le pays de naissance était inconnu pour les 3 (6%) derniers cas. Pour les autres cas, la proportion de malades nés en France et au Maghreb étaient respectivement de 34% ( $p=0,64$ ) et de 14% ( $p<0,01$ ). Finalement, 31 (66%) cas de tuberculose à *M. bovis* étaient extrapulmonaires (dont 6 cas étaient pulmonaires et extrapulmonaires) alors que l'atteinte extrapulmonaire est plus rare (37%,  $p<0,01$ ) pour les autres cas de tuberculose.

Il n'y avait pas de différence significative entre les cas de tuberculose à *M. bovis* et les autres cas pour l'âge et les antécédents de traitement antituberculeux.

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

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

Pour cela, le CNR-MyRMA a réalisé une **enquête rétrospective concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants de  $\leq 5$  ans** à travers son réseau pour les cas de 2000 à 2010 et depuis 2011





lors de l'enquête annuelle auprès des laboratoires.

Le **Tableau 25** donne la distribution des cas à culture positive selon les années. Il **semble y avoir une légère augmentation du nombre de cas** en 2012, par rapport aux années précédentes. Cependant ce fait reste à confirmer et un recueil des informations sur ces cas est en cours pour les confronter aux données de l'InVS. Un cas signalés dans un DOM est en fait un sujet non résident en France.

**Tableau 25 : Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants de 5 ans et moins de 2000 à 2012**

Année	Nombre de cas à culture positive
2000	1
2001	1
2002	1
2003	1
2004	0
2005	1
2006	2
2007	1
2008	1
2009	1
2010	1
2011	0
<b>2012</b>	<b>5 (en cours)</b>
<b>Total</b>	<b>16</b>

### **Protocole de recherche clinique « méningites communautaires en France »**

Le CNR-MyRMA (Emmanuelle Cambau) à participe au travail « Cohorte nationale observationnelle des méningites bactériennes communautaires de l'adulte » (PHRC régional, responsable Xavier Duval, hôpital Bichat) qui recense les méningites bactériennes en France chez l'adulte et évalue leur évolution. Aucun cas de méningite tuberculeuse n'a été inclus en 2013.

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

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

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

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



## 3.2. Surveillance de la lèpre en France

Nous avons poursuivi la surveillance de la lèpre en France. En 2013, nous avons identifié 24 cas au travers des prélèvements de patients résidant en France et reçus au CNR-MyRMA (18 nouveaux cas et 6 rechutes) : 13 de Mayotte (13 nouveaux cas), 4 de Nouvelle Calédonie (1 nouveau cas, 3 rechutes), 1 de Guadeloupe (1 rechute) et 6 de France métropolitaine (1 à Paris-Pitié-Salpêtrière, 2 à Paris-Saint Louis, 1 à Rennes, 1 à Chambéry, 1 à Rouen) chez des immigrants de pays ou région où la lèpre est encore présente ou ayant séjourné dans ces pays.

En 2013, nous avons effectué une mission au dispensaire de léprologie de **Mayotte (Mamoudzou), département français où la lèpre reste prévalente** (~30 cas /an soit ~15 cas / 100 000 h). Nous avons travaillé avec la responsable, le Dr Anne-Marie de Montera, le Médecin léprologue, le Dr Dalila Mohand-Oussaid et l'infirmier du, Mr Saïdy.

Nous avons décidé de mener une **surveillance systématique des cas de lèpre** de Mayotte et (a) de compléter les données historiques pour chaque cas (famille, mode de vie...) et (b) de soumettre systématiquement à l'analyse bactériologique (microscopie, PCR, gènes de résistance) tous les cas de lèpre multibacillaire vus au dispensaire, nouveaux cas et rechutes (les prélèvements de biopsie sont acheminés au CNR-MyRMA via le laboratoire du CH de Mayotte, Dr Sophie Olivier).

En 2013, 15 cas de lèpre clinique ont été diagnostiqués dont 13 bactériologiquement confirmés (cf section 2.2.5.c) : 6 étaient nés à Mayotte et 8 à Anjouan, le dernier étant né à Madagascar et émigré à Mayotte. La moyenne d'âge était de 31 ans et deux patients avaient moins de 18 ans (nés à Mayotte).

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

En 2014, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser, en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain, le génotypage (empreintes digitales génomiques) de 115 souches de *M.tuberculosis* non MDR et 83 souches MDR, **soit au total 198 souches**.

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

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

### 3.3.1. Complément bactériologique des enquêtes épidémiologiques « autour d'un cas non MDR »

En 2014, **81 souches non MDR ont été génotypées dans cette indication (Tableaux 26 et 27)**

#### 26 situations de suspicion de transmission en collectivité (78 cas) :

Le génotypage a permis de **confirmer la relation entre les cas dans 14 des 26 situations (total 48 cas)**. Ces 14 situations comportaient chacune de **2 à 11 cas bactériologiquement reliés** :



- 2 fois au sein de familles (2 fois 2 cas liés)
- 2 fois au sein d'une école (1 épisode de 2 cas liés ; 1 cas lié à 10 cas de 2012, **soit un épisode de 11 cas au total sur 2 ans**)
- 1 fois au sein d'un même foyer de **travailleurs migrants (10 cas suspects mais en fait 3 groupes de 2 cas liés avec des souches différentes + 4 cas sporadiques)**
- 8 fois dans un contexte **amical ou de travail** (4 fois 2 cas liés ; 1 fois 3 cas liés ; 1 fois 5 cas liés ; 1 fois 5 cas liés entre eux et aussi liés à 4 cas de 2012, **soit un épisode de 9 cas au total sur 2 ans ; un épisode de 10 cas correspondant en fait à 2 groupes, chacun avec une souche distincte : 1 groupe de 8 cas et 1 groupe de 2 cas.**
- 1 fois dans un **milieu carcéral** (4 cas liés entre eux et liés aussi à 2 cas de 2012, **soit un épisode de 6 cas au total sur 2 ans**).

**1 situation de suspicion de transmission nosocomiale (3 cas) :**

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre ces 3 cas. Ces 3 cas sont également liés à 2 cas pour lesquels un génotypage a été réalisé en 2012. Au total, il s'agit de 5 cas liés dans une situation de transmission patient/patient et patient/soignant à l'hôpital de Niort.

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

**Tableau 26 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR- MyrMA en 2013, classés selon le contexte épidémiologique, hors MDR**

Contexte	Lieu	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement	Lignée	
Famille	Argenteuil	2	2	« nt »	
	Créteil	2	2	Haarlem	
	Paris	2	0		
	Rennes	2	0		
	La Réunion	2	0		
Ecole + famille	Maisons-Alfort	2 (+ 10 de 2012)	1 (+ 10 de 2012)	S	
	Melun	2	2	EAI	
Communauté (amis)	Nantes	5	5	Haarlem	
	Morlaix	3	2	Haarlem	
	Paris	3	3	« nt »	
	Paris	2	2	LAM	
	Mureaux (78)	2	2	<i>M. bovis</i>	
	Villetaneuse	6 (+ 6 de 2012)	5 (+ 4 de 2012)	Delhi/CAS	
	Valencienne	10	8	« nt »	
				2	« nt »
	Auxerre	2	2	S	
	Caen	3	0		
	Créteil	2	0		
	Créteil	2	0		
	Lorient	2	0		
Paris	2	0			



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2013 (avril 2014)

	Paris	1 (+ 1 de 2012)	0	
	Rennes	2	0	
	Toulouse	1 (+ 3 de 2012)	0	
Milieu carcéral	Fleury Mérogis	4 (+ 4 de 2012)	4 (+ 2 de 2012)	« nt »
	Fleury Mérogis	2	0	
Foyer travailleurs migrants	Montreuil	10	2	« nt »
			2	Dehli/CAS
			2	EAI
Patient/soignant et Patient/patient	Niort	3 (+ 2 de 2012)	3 (+ 2 de 2012)	« nt »
<b>Total</b>		<b>81</b>	<b>51</b>	

Tableau 27 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques en collectivité et en milieu de soin : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2013 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage).

	Collectivités et familles	Milieu de soin
<b>2006</b>	11 enquêtes (total : 28 cas suspects) 7 épisodes confirmés : total 17 cas, 2 à 4 cas/épisode	6 enquêtes (total : 23 cas suspects) 3 épisodes confirmés : total 6 cas, 2 cas/ épisode
<b>2007</b>	19 enquêtes (total : 50 cas suspects) 6 épisodes confirmés : total 23 cas, 2 à 5 cas/épisode	3 enquêtes (total : 9 cas suspects) 1 épisode confirmé : total 2 cas
<b>2008</b>	24 enquêtes (total : 65 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 45 cas, 2 à 10 cas/épisode	7 enquêtes (total : 21 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 13 cas, 2 à 7 cas/épisode
<b>2009</b>	12 enquêtes (total : 36 cas suspects) 12 épisodes confirmés : total 34 cas, 2 à 6 cas/épisode	6 enquêtes (total : 19 cas suspects) 5 épisodes confirmés : total 12 cas, 2 à 4 cas/épisode
<b>2010</b>	19 enquêtes (total : 44 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 35 cas, 2 à 5 cas/épisode	7 enquêtes (total 15 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 9 cas, 2 à 3 cas/épisode
<b>2011</b>	22 enquêtes (total : 65 cas suspects) 17 épisodes confirmés : total 44 cas, 2 à 5 cas/épisode	4 enquêtes (total 13 cas suspects) 2 épisodes confirmés : total 4 cas, 2 cas/épisode
<b>2012</b>	27 enquêtes (total : 91 cas suspects) 21 épisodes confirmés : Total 64 cas, 2 à 10 cas/épisode	4 enquêtes (total 11 cas suspects) 3 épisodes confirmés : Total 6 cas, 2 cas/épisode
<b>2013</b>	26 enquêtes (total : 78 cas suspects) 14 épisodes confirmés : Total 50 cas, 1 à 8 cas/épisode À noter : 1 cas liés à 10 cas de 2012 ; 1 épisode de 5 cas liés à 4 cas de 2012 ; 1 épisode de 4 cas liés à 2 cas de 2012	1 enquête (total 3 cas suspects) 1 épisode confirmé de 3 cas, liés à 2 cas de 2012



### **3.3.2. Suspensions de rechute**

En 2013, le CNR-MyrMA n'a pas reçu de souches de patients suspects de rechute de tuberculose pour génotypage (**tableau 28**).

### **3.3.3. Suspensions de contamination de laboratoire**

Nous avons reçu 34 souches correspondant à 13 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. Pour 9 de ces épisodes, le génotypage a confirmé la contamination de laboratoire (souches non distinguables), totalisant 22 souches, par groupes de 2 à 5 souches (**tableau 28**)

**Tableau 28 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* dans le cadre des suspicions de rechutes de tuberculose et de suspicions de contaminations de laboratoire : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2013**

	<b>Suspicion de rechutes</b>	<b>Suspicion de contamination de laboratoire</b>
<b>2006</b>	2 suspicions 0 confirmation	25 enquêtes (total : 78 souches) 19 épisodes confirmés : total 48 cas, 2 à 4 cas /épisode
<b>2007</b>	1 suspicion 1 confirmation	12 enquêtes (total : 28 souches) 8 épisodes confirmés : total 18 cas, 2 à 3 cas/épisode
<b>2008</b>	3 suspicions 3 confirmations	11 enquêtes (total : 28 souches) 8 épisodes confirmés : total 17 cas, 2 à 3 cas/épisode
<b>2009</b>	5 suspicions 5 confirmations	21 enquêtes (total : 59 souches) 13 épisodes confirmés : total 36 cas 2 à 6 cas/épisode
<b>2010</b>	0 suspicion	8 enquêtes (total : 40 souches) 5 épisodes confirmés : total 33 cas, 2 à 8 cas/épisode
<b>2011</b>	3 suspicions 3 confirmations	15 enquêtes (total : 40 souches) 9 épisodes confirmés : total 25 cas 2 à 5 cas/épisode
<b>2012</b>	8 suspicions 2 confirmations	18 enquêtes (total : 45 souches) 13 épisodes confirmés : Total 28 cas, 2 à 3 cas/épisode
<b>2013</b>	0 suspicion 0 confirmation	13 enquêtes (total : 34 souches) 9 épisodes confirmés : Total 22 cas, 2 à 5 cas/épisode

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

Nous avons en 2013 analysé de manière systématique 83 souches MDR reçues au CNR-MyRMA par la technique du MIRU-VNTR 24 loci. Cette technique permet à la fois une analyse phylogénique (identification des clades ou lignées ou phylums) et l'identification de cas potentiellement reliés (empreintes digitales génomique).

Sur le plan phylogénique (**tableau 29**), on voit qu'entre 2006 et 2013, la proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing est passée de 19 à 49 %, augmentation qui est à mettre en relation avec l'augmentation de la part des cas MDR chez des patients nés en ex-URSS. Par rapport à 2012, on note que la proportion des souches



MDR Beijing a augmenté de 8% et celle des souches Haarlem de 400%. En parallèle, la proportion des souches LAM a diminuée de 37% et celle des souches « nt » de 48%.

Sur le plan des empreintes digitales génomiques, l'analyse des résultats révèle l'existence de **9 clusters de souches pour un total de 38 souches (46%) partageant des codes MIRU 24 identiques**. La majorité de ces souches (n=29, 76%) sont rattachés à la lignée Beijing (en 5 groupes de souches : 11, 11, 4, 2, et 1 groupée avec 1 souche de 2012). Les autres clusters sont rattachés aux lignées LAM (3 souches), URAL (2 souches), « nt » (en 2 groupes de souches : 2, et 1 groupée avec 1 souche en 2012) et S (1 souche groupée avec 1 souche de 2011).

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

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

#### **1 cluster de 11 souches**, dont :

- 2 souches MDR isolées de patients originaires de Géorgie. Ces souches sont identiques par leurs phénotypes et génotypes de résistance, mais sans lien épidémiologique retrouvé en France.

- 5 souches MDR qui diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance, isolées de patients originaires de Géorgie (n=3), de Tchétchénie (n=1), et du Kosovo (n=1).

Pour 1 de ces souches isolée d'un patient originaire de **Géorgie**, un lien épidémiologique a été établi avec un patient de 2012 né aussi en **Géorgie** dans le cadre d'une **transmission intra-familiale**.

- 4 souches XDR qui diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance, isolées de patients originaires de Géorgie.

#### **1 cluster de 11 souches**, dont :

- 5 souches MDR qui diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance, isolées de patients originaires de Géorgie (n=4) et d'Arménie (n=1).

Pour 1 patient né en **Arménie** un lien épidémiologique a été établi avec un patient de 2012 né en **Tchéchénie (transmission possible dans un foyer d'hébergement pour demandeur d'asile à Montauban)**.

- 2 souches **XDR** isolées de patients originaires de **Géorgie**. Ces souches sont identiques par leurs phénotypes et génotypes de résistance, avec un lien épidémiologique prouvé (**transmission intra-familiale**).

- 1 souche **XDR** isolée d'un patient immunodéprimé né en **France** ayant un lien épidémiologique établi avec un patient de 2012 né en **Géorgie (transmission présumée sur un lieu de travail confiné au contact de migrants)**.

- 3 souches XDR qui diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance, isolées de patients originaires de Géorgie.

#### **1 cluster de 4 souches**, dont :

- 2 souches MDR qui diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance, isolées de patients originaires de Géorgie et d'Ukraine, respectivement.

- 2 souches XDR qui diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance, isolées de patients originaires de



Géorgie.

**1 cluster de 2 souches** comprenant 1 souche MDR isolée d'un patient originaire de Tchétchénie et 1 souche XDR isolée d'un patient originaire de Géorgie.

**1 souche clusterisée avec 1 souche de 2012**, isolées de patients originaires de **Guinée** avec un lien épidémiologique prouvé (**transmission intra-familiale**).

### **Clusters rattachés à la lignée LAM**

**1 cluster de 3 souches** comprenant 2 souches MDR qui diffèrent par leurs phénotypes et génotypes de résistance, isolées de patients originaires de Lituanie et de Géorgie et 1 souche XDR isolée d'un patient originaire d'Ukraine.

### **Clusters rattachés à la lignée URAL**

**1 cluster de 2 souches** comprenant 1 souche MDR isolée d'un patient originaire d'Ukraine et 1 souche XDR isolée d'un patient originaire de Géorgie.

### **Cluster de souches dites « nt »**

#### **1 cluster de 2 souches**

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

**1 souche MDR de 2013 clusterisée avec 1 souche de 2012**, isolées de patients originaires du Sénégal avec un lien épidémiologique prouvé (**transmission intra-familiale**).

### **Clusters rattachés à la lignée S**

**1 souche clusterisée avec 1 souche de 2011**, isolées de patients originaires d'Algérie avec un lien épidémiologique prouvé (**transmission sur le lieu de travail**).

**Au total**, l'analyse détaillée des 9 clusters totalisant 38 souches MDR-XDR partageant des codes MIRU 24 identiques en 2013 a permis de confirmer un **lien bactériologique et épidémiologique pour 1 grappe de 2 cas MDR de 2013 (Tableau 30)** :

- 2 frères nés en Géorgie : souche XDR de lignée Beijing

D'autre part la comparaison des codes MIRU 24 des souches de 2013 avec les souches des années antérieures a permis de confirmer un **lien bactériologique et épidémiologique pour 6 grappes de 2 cas (tableau 30)**:

- Contacts sur lieu de travail (nés en France et en Géorgie) : souche XDR de lignée Beijing
- Contacts en foyer (nés en Arménie et en Tchétchénie) : souche MDR de lignée Beijing
- Mère et fils nés en Géorgie : souche MDR de lignée Beijing



- Mère et fils nés en Guinée : souche MDR de lignée Beijing
- Mari et femme nés au Sénégal : souche MDR de lignée nt
- Contacts sur le lieu de travail (nés en Algérie): souche MDR de lignée S

**Au total, la quasi totalité des cas liés avec des souches de la lignée Beijing ont concerné des patients nés dans des pays où ces souches sont prévalentes. A noter cependant 2 cas de transmission de souche MDR Beijing chez des patients nés en Guinée (transmission intrafamiliale) et entre géorgien et français sur un lieu de travail.**

**Tableau 29 : Evolution de 2006 à 2013 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignées appartenant à la superfamille East African Indian, et en bleu à la superfamille Euro-American)**

Lignée	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total
<b>Groupe PGG1</b>									
EAI	2	1	0	0	0	0		2	5
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	3	4	1	9
Beijing	11	9	15	17	19	23	38	41	173
West African 2	1	1	0	0	0	0	1	1	4
West African 1	0	0	0	0	0	1			1
Canettii	1	0	0	0	0	0			1
<b>Groupe PGG2</b>									
Haarlem	5	0	2	2	2	3	2	10	26
LAM	5	7	3	3	4	8	16	10	56
URAL	4	0	2	1	0	1	2	3	13
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	0		1	3
Cameroon	2	2	3	1	3	1	3		15
Ghana (T1)	4	1	5	6	2	3	1	1	23
T1-T2-T3 et « nt »	19	14	18	19	12	19	21	11	133
<b>Divers</b>									
S	2	2	3	1	3	3	3	2	19
NEW-1	0	0	0	0	0	1			1
Bovis	0	0	0	0	0	1			1
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>37</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>45</b>	<b>67</b>	<b>91</b>	<b>83</b>	<b>483</b>

Le **Tableau 30** résume les cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement parmi les souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2013, identifiés grâce au génotypage systématique. Le nombre de grappes de cas reliés a augmenté de 1 à 2/an en 2006-2009 à 5 en 2010-12 et 7 en 2013.

**Tableau 30 : Résultats du génotypage systématique des souches de *M.tuberculosis* multirésistantes**





(MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2013 : cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement

	N	Cas reliés*(contexte, pays de naissance)	Lignée
<b>2006</b>	53	1 épisode de 2 cas (famille, Roumanie)	Non déterminé
<b>2007</b>	38	1 épisode de 4 cas (famille + voisins, Portugal) 1 épisode de 2 cas (famille, Cameroun)	LAM Non déterminé
<b>2008</b>	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
<b>2009</b>	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Côte d'Ivoire)	Nt Ghana
<b>2010</b>	45	1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Tibet) 1 épisode de 2 cas (famille, Mongolie) 1 épisode de 2 cas (famille, Viet-nam)	nt Beijing Beijing Beijing
<b>2011</b>	67	1 épisode de 3 cas (famille, Arménie) 1 épisode de 2 cas (malade vers soignant, France) 1 épisode de 3 cas (famille, Algérie) 1 épisode de 2 cas possible (famille, Roumanie) 1 épisode de 2 cas possibles (contact occasionnel, France)	Beijing Cas-Delhi Nt URAL LAM
<b>2012</b>	92	1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie) 1 épisode de 2 cas (famille, France) 1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie) 1 épisode de 4 cas (famille Congo et université française)	Beijing nt LAM LAM
<b>2013</b>	83	1 épisode de 2 cas XDR (famille, Géorgie) 1 épisode de 1 cas (famille, Géorgie) <sup>§</sup> 1 épisode de 1 cas (famille, Guinée) <sup>§</sup> 1 épisode de 1 cas (foyer, Arménie) <sup>§</sup> 1 épisode de 1 cas XDR (lieu de travail, France) <sup>§</sup> 1 épisode de 1 cas (lieu de travail, Algérie) <sup>§</sup> 1 épisode de 1 cas (famille, Sénégal) <sup>§</sup>	Beijing Beijing Beijing Beijing Beijing S « nt »

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

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

<sup>§</sup> cas lié avec un cas des années précédentes, cf texte pour les détails sur ces cas antérieurs



## 4. Alertes

### 4.1. Alertes et enquêtes 2013 sur des cas de tuberculose

Le CNR-MyRMA a été consulté dans le cadre des 3 alertes suivantes :

- Conduite à tenir pour les contacts d'un patient MDR employé dans une crèche du 92 (Juin 2013)
- Demande d'autorisation à prendre l'avion des Antilles à Paris pour un patient MDR (Mai 2013)
- Participation au groupe d'expertise collective d'urgence concernant la saisine 2013-SA-0029 « Tuberculose des éléphants ». Il s'agissait de donner des conseils sur le risque de transmission tuberculeuse des éléphants du parc la Tête d'Or à Lyon.

### 4.2. Alertes et enquêtes 2013 sur des cas d'infection à mycobactérie atypique

Le CNR-MyRMA a été consulté dans le cadre des 4 alertes suivantes :

- Un cas d'infection cutanée à *M. massiliense* après mésothérapie (Dijon, Novembre 2013), prélèvements d'eau envoyés au CNR : analyses en cours.
- Un cas d'infection cutanée à *M. bolletii* sur une plaie de cheville chez un patient immunodéprimé (octobre 2013): demande de prélèvements d'environnement.
- Un cas d'infection cutanée à *M. marinum* chez une patiente immunodéprimée ayant eu des soins en piscine d'eau de mer (Caen, juillet 2013). La souche a été isolée de l'eau de piscine. Le génotypage (rep-PCR diversiLab®) par le CNR a montré que ces 2 souches (patient et eau de piscine) avaient des profils indistinguables et appartenaient à un même cluster.
- Un cas d'infection d'une prothèse mammaire à *M. fortuitum* (La Réunion, juillet 2013), les prélèvements d'eau de l'évier de la chambre de la patiente et de la douche étaient positifs à *M. fortuitum*. La comparaison de ces souches par génotypage (rep-PCR diversiLab®) a montré que les souches de l'eau et de la patiente étaient indistinguables et appartenaient à un même cluster. Une enquête des pratiques a été réalisée au sein de l'hôpital.



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

### 5.1. Information

De 2006 à 2013, le site internet <http://cnrmyctb.free.fr> a été régulièrement mis à jour pour :

- la fiche d'information à fournir au CNR-MyRMA en cas de demande d'expertise bactériologique (identification, tests de sensibilité aux antibiotiques, génotypage...) a été modifiée en 2013,
- les fiches des enquêtes annuelles sur la tuberculose multirésistante et la méningite tuberculeuse qui peuvent être, soit remplies directement en ligne sur le site, soit imprimées puis remplies manuellement et envoyées,
- les résultats annuels de la surveillance de la tuberculose multirésistante et de la résistance primaire et secondaire,
- les nouvelles publications du CNR-MyRMA,
- la mise en ligne des rapports d'activité du CNR-MyRMA,
- la mise en ligne des diapositives des formations organisées ou co-organisées par le CNR-MyRMA.

### 5.2. Formation

#### Accueil de stagiaires et missions de formation en 2013

**Lorenzo Guglielmetti**, 6 mois, registre MDR

**Diane Martin**, 2 mois, registre MDR

**Mélanie Le Goff**, « L'unique topoisomérase de type II de *Mycobacterium leprae* : témoin de la diversité des ADN gyrases », Paris, M2, UPMC, 8 mois. **Frédéric Campos**, « Etude de l'effet de différentes substitutions de la sous unité GyrB sur l'affinité pour les quinolones de l'ADN gyrase de *Mycobacterium tuberculosis* », Master 1 (8 semaines)

**Aurélie Chauffour**, mémoire pour Validation des Acquis d'Expérience (VAE), Lyon

**Anne Pham**, « Investigation de la résistance aux aminosides/peptide cyclique dans les isolats cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistants ». Master 1 Microbiologie appliquée et Génie biologique - Paris 11, 6 mois.

**Technicienne de l'Institut Pasteur d'Alger** pour une formation à l'utilisation de MGIT pour les antibiogrammes (2 semaines)

**Yanasik Céline**, Etudiante en L3 (UPEC) en stage sur l'examen microscopique avec coloration de Ziehl et d'auramine

**Gibaud Laurianne**, technicienne du laboratoire privé de Marne La Vallée (Dr Philippe Weber) pour formation de travail en laboratoire P3

**Stuber Fernandez Céline**, technicienne du laboratoire du CH de Metz en stage d'observation des pratiques de mycobactériologie

**Sokleaph Cheng**, Biologiste responsable du laboratoire des mycobactéries de l'Institut Pasteur du Cambodge, stage sur l'étude de l'épidémiologie des souches résistantes de *M. tuberculosis* complex du CNR, arrivée le 1<sup>er</sup> décembre 2012 pour 1 an (départ en novembre 2013)

#### Mission

Mission d'E. Cambau sur la lèpre à Mayotte.



## Enseignement sur les mycobactéries et la tuberculose

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

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

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

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

Master M2 « Microbiologie », Paris 6

DU Antibiotiques et Antibiothérapie, Université Paris 7

DIU Dermatologie infectieuse et tropicale, Université Paris 6,

DIU Antibiotique, Université Tours-Poitiers

DIU Antibiotique, Université Nice Sophia-Antipolis

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

DIU Chimiothérapie des infections nosocomiales, Université Paris 11 et 12

DIU médecine tropicale – santé internationale

DIU Pathologies Infectieuses de la femme enceinte, du fœtus et du nouveau né, Université Paris 11

DIU « tuberculose », Université Pierre et Marie Curie, Université Libre de Strasbourg

DES Biologie Médicale, Université de Paris

DESC Maladies Infectieuses et Tropicales

DIU de pathologie moléculaire, Université Paris Diderot et Université de Nice

## 5.3. Activités de conseil

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

Sur les 83 patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants identifiés en 2013, 47 ont fait l'objet de conseils thérapeutiques et de prise en charge des malades lors de 14 réunions du « **Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile** ».

Au total 193 dossiers ont été discutés dans ce groupe durant les 14 réunions de 2013 car chaque patient a fait l'objet de plusieurs présentations pour modification de traitement (**Tableau 33**) :

- 47 cas de tuberculose MDR de 2013. Selon leur complexité, les dossiers de ces cas ont été examinés lors de 1 à 4 réunions. Les dossiers de 15 autres cas de tuberculose MDR (de fin d'année) ont été discutés début 2013.

- 5 dossiers de sujet contact de cas MDR pour discussion de prophylaxie

- 51 dossiers de tuberculose MDR des années précédentes (analyse de l'évolution sous traitement)

- 18 cas de tuberculose compliquée non MDR

En 2013, les participants réguliers aux réunions du « Groupe Thérapeutique » étaient :

- l'équipe du CNR-MyRMA,

- 3 praticiens du Centre Médical de Bligny (Mathilde Jachym, Nathalie Methivier, Damien Le Du),

- 1 pédiatre de l'hôpital trousseau (Katarina Chadelat, Guillaume Thouvenin),

- 2 pneumologues (Bertrand Dautzenberg Pitié-Salpêtrière, Claire Andrejak Amiens),

- 1 membre du SAMU social de Paris (Bénédicte Rivoire)

- 1 infectiologue de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Benoit Henry)

**L'activité du « Groupe thérapeutique », qui avait déjà augmenté de 50% de 2009 à 2011 puis doublé entre 2011 et 2012 a augmenté de 30% en 2013 comme le montre le Tableau 31.**



**Tableau 31 : Activités de conseil assurées par le « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries difficiles à traiter » du CNR-MyrMA de 2004 à 2013**

	<b>N réunions de travail</b>	<b>N dossiers examinés</b>	<b>Types de dossiers</b>
<b>2006</b>	5	11	- 2 cas XDR 2006 - 9 cas MDR 2006 (1 grossesse)
<b>2007</b>	5	13	- 2 cas XDR 2007 - 8 cas MDR 2007 (1 enfant 18 mois) - 3 prophylaxies contacts MDR
<b>2008</b>	6	44	- 22 cas MDR 2008 - 19 cas MDR 2007 (suivi) - 3 prophylaxies contacts MDR
<b>2009</b>	8	46	- 20 cas MDR 2009 - 18 cas MDR 2008 (suivi) - 8 prophylaxies contacts MDR
<b>2010</b>	9	64	- 22 cas MDR 2010 - 33 cas MDR 2008-09 (suivi) - 7 cas tuberculose compliquées non MDR - 1 prophylaxie contacts MDR - 1 mycobactériose
<b>2011</b>	11	70	- 27 cas MDR 2011 - 40 cas MDR 2009-10 (suivi) - 3 cas tuberculose compliquées non MDR
<b>2012</b>	11	148	<b>Les 148 dossiers examinés correspondent à 83 patients :</b> - 48 cas MDR-XDR 2012 (dossiers examinés 1 à 5 fois chacun) - 21 cas MDR 2011 (suivi) - 4 cas MDR 2010 (suivi) - 7 prophylaxies contacts MDR - 3 cas tuberculose compliquées non MDR
<b>2013</b>	14	193	<b>Les 193 dossiers examinés correspondent à 121 patients :</b> - 47 cas MDR-XDR 2013 (dossiers examinés 1 à 4 fois chacun) - 49 cas MDR 2012 - 2 cas MDR 2011 - 5 prophylaxies contacts MDR - 18 cas tuberculoses compliquées non MDR

Par ailleurs Nicolas Veziris fait partie des experts ERS/OMS pour les conseils de prise en charge des TB MDR en Europe. Dans ce cadre un avis thérapeutique a été donné. Les premiers cas pris en charge par ce système ont été rapportés (ERS/WHO Tuberculosis Consilium: reporting of the initial 10 cases. D'Ambrosio L1, Tadolini M, Dupasquier S, Tiberi S, Centis R, Dara M, Blasi F, Migliori GB Eur Respir J. 2014 Jan;43(1):286-9.).



### **Conseil pour la prise en charge des infections à mycobactéries atypiques**

En 2013, nous avons été en contact avec des collègues de Birmingham (UK) pour 3 cas groupés d'infections à *M. chelonae*. Parmi les 3 souches envoyées, une seule a été identifiée par nous comme *M. chelonae*, les deux autres n'étant pas des mycobactéries.

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

### **Autorités sanitaires nationales**

- Indicateurs sanitaire tuberculose pour la DREES-DGS : interrogation 11 juillet 2013, réponse le 3 septembre.
- Vincent Jarlier et Emmanuelle Cambau ont participé en 2013 aux travaux du Haut conseil de la santé publique pour l'actualisation des recommandations de mise en œuvre des enquêtes autour d'un cas (plusieurs réunions).
- Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier ont participé en 2013 aux travaux menés à la Mutuelle de Santé Agricole (MSA) sur la tuberculose bovine et le risque de tuberculose chez les personnes en contact avec les bovins (plusieurs réunions).
- Vincent Jarlier, Jérôme Robert et Emmanuelle Cambau ont participé en 2013 ( plusieurs réunions) aux travaux du Haut conseil de la santé publique pour l'écriture des recommandations sur la prise en charge de la tuberculose à bacilles résistants et de la place du diagnostic moléculaire (saisines de la DGS).
- Emmanuelle Cambau a été convoquée et auditionnée à l'HAS (décembre 2013) au sujet de l'évaluation des risques liés aux pratiques de mésothérapie à visée esthétique.
- Laurent Raskine a participé aux réunions de la HAS sur le risque infectieux lié aux prélèvements post-portem pour les transplantations d'organe.

### **Autorités sanitaires internationales**

- Emmanuelle Cambau a participé au travail du réseau de laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) créé sous l'égide de l'ECDC : 4ème workshop en avril 2013 à La Haye.
- Emmanuelle Cambau a participé en avril 2013 à la réunion de l'European Union Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) statuant sur la demande de mise du nouvel antituberculeux Bedaquiline (TMC-207) sur le marché européen.
- Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier ont été auditionnés auprès de l'European Agency for Medicine (Londres, Mai 2013) pour l'expertise du delamanid (OPC).
- Enquête OMS sur la stratégie nationale tuberculose, interrogation via la DGS : 28 janvier 2013, réponse du CNR-MyRMA au questionnaire 31 janvier.



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

Le CNR-MyRMA était en 2013 adossé à l'équipe de recherche ER5 (EA 1541), UPMC site Pitié-Salpêtrière.

### 6.1. Travaux de recherche 2013 ou en cours

#### 6.1.1. Chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries

##### Tuberculose

##### **Etude de facteurs déterminant *in vivo* la sélection des mutants résistants aux antituberculeux**

Ce travail a été effectué par Nicolas Veziris dans le laboratoire du Dr Anne Lenaerts (Mycobacterial Research Laboratories, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, USA).

La lutte antituberculeuse est menacée par l'émergence des souches multirésistantes (MDR), et plus récemment ultrarésistantes (XDR) de *M. tuberculosis*, en particulier chez les patients immunodéprimés (notamment ceux infectés par le VIH). La compréhension des facteurs déterminant *in vivo* la sélection de mutants résistants aux antituberculeux est une étape essentielle pour mettre en place des stratégies préventives et des traitements adaptés. Un modèle animal permettant d'étudier ce phénomène et l'activité des antibiotiques dans des conditions mimant l'immunodépression permettrait cela. Or ce modèle n'existe pas encore et les connaissances actuelles sur l'émergence de mutants résistants sous traitement, reposent principalement sur des données *in vitro*.

Nous avons mis au point un modèle permettant de réaliser *in vivo*, un test de fluctuation permettant de mesurer le taux de mutation. Ce modèle a été mis à profit pour comparer le taux de mutation dans trois lignées murines différentes Balb/C (souris de référence immunocompétentes), Nude (souris immunodéprimées athymique, déficiente en lymphocytes T comme les patients VIH) et souris C3HeB/FeJ (développant un granulome nécrotique mimant les lésions humaines).

60 souris de chaque lignée ont été infectées par aérosol par la souche virulente *M. tuberculosis* Erdman puis gardées en observation pendant 4 semaines pour sacrifice. Les poumons ont été prélevés. Un fragment du broyat a été utilisé pour dénombrement de la charge bacillaire totale et le reste du volume a été entièrement cultivé pour dénombrement des bacilles résistants à 0,2 mg/l d'isoniazide.

La charge bacillaire pulmonaire a cru jusqu'à environ 6 log<sub>10</sub> UFC pour les souris Balb/C et C3HeB/FeJ et 8 log<sub>10</sub> pour les souris Nude.

Toutes les souris Nude hébergeaient des mutants résistants à l'isoniazide contre environ 1/3 des C3HeB/FeJ et 60% des Balb/C. De façon intéressante, la charge bacillaire en mutants résistants variait aussi selon la lignée murine. Aucune souris Balb/C n'hébergeait de grande quantité de bacilles contre toutes les Nude et quelques C3HeB/FeJ. Ces observations se traduisent en chiffres : le taux de mutation le plus important était chez les Balb/C ( $3.9 \times 10^{-7}$ ) suivi des C3HeB/FeJ ( $8.9 \times 10^{-8}$ ) puis des Nude ( $4.2 \times 10^{-8}$ ). De même le fitness relatif, qui est la croissance relative des cellules originale sur celles des mutants, diminuait-il dans le même ordre : Balb/c (=3), C3HeB/FeJ (=1), Nude (=0,47).



Ainsi il est apparu que plus les souris sont immunodéprimées moins elles « créent » de mutants (diminution du taux de mutation) mais plus elles sont permissives à la croissance des mutants de fitness réduit. Ces données apportent un éclairage nouveau sur le sur-risque de sélection de mutants résistants chez les immunodéprimés. La principale cause de ce sur-risque semble être chez quelques patients l'existence de fortes charges bacillaires de mutants résistants avant même le début du traitement. Ces probabilités devraient être prises en compte dans l'élaboration des régimes antituberculeux pour ces populations.

## Ulcère de Buruli

### **Evaluation de l'activité stérilisante de traitements intermittents oraux dans l'infection à *Mycobacterium ulcerans* chez la souris**

#### **Objectif**

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'efficacité stérilisante de traitements intermittents oraux entièrement supervisés. Nous avons testé plusieurs schémas thérapeutiques intermittents (cf ci-dessous). Le travail a été réparti en 2 expériences « chevauchantes » en raison du nombre très élevé de souris à inclure pour obtenir des résultats significatifs : 60 par groupe traité, dont 40 pour la surveillance des rechutes ; 30 par groupe non traité (total 540).

- rifapentine-moxifloxacine 2/7
- rifapentine-clarithromycine 2/7
- rifapentine-clarithromycine 3/7
- rifapentine-Bédaquiline 2/7
- rifapentine-streptomycine 2/7
- rifapentine-clarithromycine 5/7 (témoin positif)
- rifampicine-streptomycine 5/7 (témoin positif)
- pas de traitement (témoin négatif)

#### **Méthode**

- 540 souris BALB/c femelles âgées de 4 semaines inoculées avec la souche CU01 (~4 log/patte),
- début des traitements après une incubation de 5 semaines pour atteindre un index lésionnel de grade 2-3,
- posologies : rifampicine 10 mg/kg, streptomycine 150 mg/kg, moxifloxacine 200 mg/kg, rifapentine 10 mg/kg (quotidien) ou 20 mg/kg (intermittent), clarithromycine 100 mg/kg, TMC 25 mg/kg,
- mesure de l'**activité bactéricide** par mesure hebdomadaire de l'index lésionnel et par cultures à 4 et 8 semaines de traitement,
- mesure de l'**activité stérilisante** par le taux de rechute clinique et bactériologique au cours d'une période de 28 semaines de surveillance après la fin des traitements.

#### **Résultats**

Les index lésionnels, de grade 2-3 en début de traitement, ont augmenté jusqu'aux grades 3-4 (lésions étendues) dans le groupe non traité mais ont diminué progressivement jusqu'au grade 1 (minime lésion locale) dans tous les groupes traités.

Le nombre de bacilles cultivables a diminué jusqu'à négativation en fin de traitement dans toutes les souris des groupes avec traitement intermittent et jusqu'à négativation pour 7/10 souris du groupe rifampicine-streptomycine 5/7 (rares bactéries survivantes chez 3/10) mais a augmenté dans le groupe non traité.

Dans l'expérience 1, le nombre de rechutes durant les 28 semaines d'observation a été : 0/39 pour rifapentine-clarithromycine 3/7, 1/39 ou 1/40 pour rifapentine-moxifloxacine 2/7 et rifapentine-clarithromycine 2/7 et 5/7 (Tableau 2). Ces résultats montrent la possibilité d'obtenir une activité stérilisante avec des régimes intermittents 2/7 ou 3/7 oraux, reposant sur un total de 16 à 24 prises par rifapentine associée à la moxifloxacine ou la clarithromycine.

Les résultats des rechutes pour l'expérience 2 seront disponibles en 2014.





### **Protocole OMS de recherche clinique sur l'ulcère de Buruli**

L'étude coordonnée par l'OMS au Ghana et au Bénin (2012-14) vise à comparer dans un essai randomisé en simple aveugle l'efficacité thérapeutique sur l'ulcère de Buruli (lésions de grades 1-2) des associations rifampicine+streptomycine (injectable) et rifampicine+clarithromycine (orale) pendant 8 semaines. Au Bénin, le travail est mené par le Dr Annick Chauty et son équipe au CDTUB de Pobè. Jérôme Robert a participé à l'élaboration du protocole avec le groupe de l'OMS et aide à l'organisation de l'essai par des séjours réguliers sur place.

### **Lèpre**

Nous avons mis au point en 2011 un modèle d'infection de type « proportional method » chez la souris Nude avec la souche « Hoshizuka 4 » de résistance modérée à l'ofloxacine (GyrA A91V). Les résultats définitifs obtenus en 2013 d'une étude mesurant l'activité *in vivo* de nouvelles fluoroquinolones sur cette souche, ont montré que la moxifloxacine et la garénoxacine conservaient une grande partie de leur activité en cas de résistance à l'ofloxacine, comparable à celle de la clarithromycine prise comme témoin. Ces résultats ont été publiés dans PLOS Neglected Tropical Diseases.

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

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

En 2010, nous avons initié un projet de synthèse de nouvelles fluoroquinolones avec l'équipe de G. Anquetin (Faculté des Sciences, Université Paris 5), projet guidé par les données de relation structure-activité obtenues à travers les travaux publiés, en particulier les nôtres, sur l'ADN gyrase des mycobactéries.

Le projet de synthèse de nouvelles fluoroquinolones initié avec l'équipe de G. Anquetin (Biochimie, Paris 5) et guidé par les données de relation structure-activité obtenues à travers nos travaux antérieurs, avaient permis d'obtenir en 2012 une 1<sup>ère</sup> série de 10 dérivés de la gatifloxacine qui ne se sont pas révélés plus actifs sur les ADN gyrases sauvage et mutées de *M.leprae* obtenues par génie génétique. Ces résultats négatifs, cependant très informatifs d'un point de vue relation structure-activité, ont été analysés et publiés en 2013 (cf publications).

Sur la base de ces 1ers résultats, une 2<sup>ème</sup> série de dérivés a été synthétisée en 2012-2013. Les résultats, très positifs, ont justifié une déclaration d'invention dans l'objectif de déposer un brevet pour plusieurs de ces dérivés, avec l'aide du service de valorisation de Paris 6 et de la SATT Lutech. Les résultats ne seront donc pas publiés pour le moment

### **6.1.3. Mécanismes de résistance chez les mycobactéries**

#### **Mécanisme de résistance acquise aux diarylquinolines chez *M. tuberculosis* : Etude de la structure de l'ATP synthase de *M.tuberculosis***

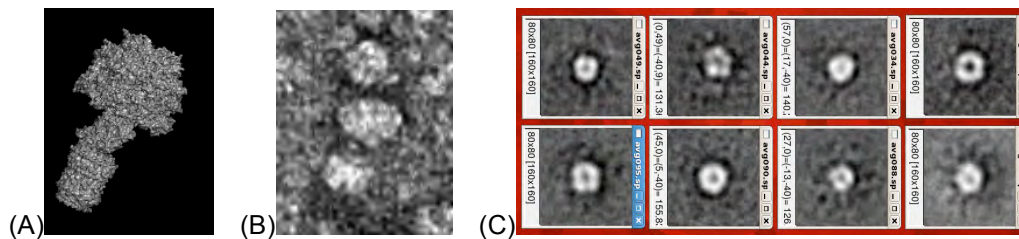
La diarylquinolines (TMC207, bédaquiline) bloque la synthèse de l'ATP en inhibant l'ATP synthase, enzyme



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

En 2013, nous avons essayé de définir les conditions permettant l'expression et la purification de forme stable de l'ATP synthase mycobactérienne chez *E.coli* avec pour objectif de déterminer par microscopie électronique la structure à basse résolution de l'enzyme.

Après mise au point d'un protocole de purification en présence de détergents à partir de fractions membranaires, les fractions purifiées ont été analysées par microscopie électronique à transmission (Jeol 2100, grossissement 40 000 x) après coloration négative à l'acétate d'uranyl. 7665 images de particules évoquant l'ATP synthase ou ses constituants ont été acquises et analysées selon l'approche des clusters (SPIDER).



**Figure 10. (A) Modèle 3D théorique de l'ATP synthase. (B) Exemple d'image obtenue en ME évoquant la structure de l'ATP synthase. (C) Exemple de 8 clusters d'images obtenus après analyse de 7665 images de ME, évoquant la structure de l'anneau C de l'ATP synthase.**

Une structure complète à basse résolution de l'ATP synthase mycobactérienne n'a pas pu être obtenue en raison du manque d'homogénéité des particules d'ATP synthase produites en présence de détergeant.

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

La résistance aux fluoroquinolones (FQ) chez *Mycobacterium tuberculosis* est principalement due à des mutations dans la seule cible des FQ chez cette espèce : l'ADN gyrase ( $GyrA_2GyrB_2$ ). La mesure de la sensibilité aux FQ (MSF) est effectuée par des méthodes phénotypiques, mais les tests génotypiques sont de plus en plus utilisés. Dans avions initié une étude visant à comparer les performances diagnostiques de la mesure de la sensibilité aux fluoroquinolones par méthodes génotypiques et phénotypiques dans un modèle murin de la tuberculose. Pour ce faire, 60 souris Swiss ont été inoculées avec *M. tuberculosis* H37Rv et traitées par lévofloxacine 200 mg/kg pendant 6 mois. Dix souris ont été sacrifiées chaque mois. Les broyats des poumons ont été mis en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen (LJ) avec et sans ofloxacine 2 mg / L ( $OFX_2$ ) (MSF « directe »). Nous avons ainsi pu constituer une banque de souches isogéniques de *M. tuberculosis* H37Rv résistantes aux quinolones avec et sans mutation dans l'ADN gyrase.

Nous avons dores et déjà obtenu le séquençage complet de 5 souches résistantes aux quinolones sans mutations dans l'ADN gyrase afin d'identifier des SNPs qui pourraient nous orienter vers de nouveaux mécanismes de résistance. Ce travail est réalisé en collaboration avec le Dr T. Joerger (Department of Computer Science Texas A&M University).

### **Détection moléculaire de la résistance aux aminosides/peptide cyclique dans les souches cliniques multirésistantes de *Mycobacterium tuberculosis***

Les aminosides, amikacine (AMK) et kanamycine (KAN) et le peptide cyclique capréomycine (CAP), sont des médicaments clés pour le traitement de la tuberculose multirésistante (MDR-TB). Les aminosides/peptide cyclique agissent en se liant à l'ARNr 16S et en inhibant la synthèse protéique. Les mutations en positions 1401, 1402 et 1484 dans le gène codant l'ARNr 16S (*rrs*) ont été associées à une résistance croisée entre ces



antituberculeux. En plus des modifications dans *rrs*, des mutations dans le gène *tlyA*, qui code une méthyltransférase à ARNr putative, et dans la région promotrice du gène *eis* (pro *eis*), qui code une aminoside acétyltransférase, pourraient être responsable de la résistance (R) à CAP et à KAN, respectivement.

La sensibilité aux aminosides/peptide cyclique a été déterminée par méthode phénotypique (méthode des proportions / milieu de Lowenstein-Jensen) et génotypique (séquençages des gènes *rrs*, pro *eis* et *tlyA*) pour 206 isolats cliniques de *M. tuberculosis* MDR collectés en 2010-2012 au CNR-MyRMA : 153 sensibles à AMK/KAN/CAP, 22 monoR-KAN, 23 R-AMK/KAN/CAP, 3 R-AMK/KAN, 2 R-CAP/KAN et 3 monoR-CAP.

Aucune mutation n'a été détectée dans les isolats sensibles à AMK/KAN/CAP, excepté pour un isolat (mutations inconnues T1404C + G1473A dans *rrs*). Parmi les 22 isolats monoR-KAN : 17 avaient une mutation dans pro *eis* (-G10A ou -G37T). Parmi les 23 isolats R-AMK/KAN/CAP : 20 avaient une mutation A1401G dans *rrs*, 1 une mutation C1402G dans *rrs*, et 2 isolats C14T dans pro *eis*. Parmi les 3 isolats R-AMK/KAN et 2 R-CAP/KAN et 3 monoR-CAP, seulement 1 R-AMK/KAN et 1 R-CAP/KAN avaient une mutation dans pro *eis* (-C14T et -G37T).

Les mutations dans *rrs* étaient responsables de la résistance à AMK dans 21/26, à CAP pour 21/28 et à KAN pour 22/50 isolats. Parmi les 28 isolats résistants à au moins KAN (incluant 22 monoR-KAN) sans mutation dans *rrs*, 20 avaient une mutation dans pro *eis*. Aucune mutation dans *tlyA* n'a été observée parmi les isolats R-KAN étudiés. Par ailleurs, aucune mutation dans *rrs*, pro *eis* et *tlyA* n'a été détectée dans 5/26 isolats résistants à au moins AMK, 8/50 isolats résistants à au moins KAN et 7/28 isolats résistants à au moins CAP, suggérant que la résistance aux aminosides/peptide cyclique peut résulter de mécanismes encore inconnus.

### **Etude de la résistance chez les mycobactéries non tuberculeuses à croissance lente : approches épidémiologique et moléculaire**

#### **Approche épidémiologique**

Nous avons mené une enquête destinée à évaluer la prévalence des résistances primaire (R-I<sup>aire</sup>) et secondaire (R-II<sup>aire</sup>) des mycobactéries non tuberculeuses à croissance lente (MNT-CL). Ce travail a porté sur 430 souches consécutives de *Mycobacterium avium*, 341 *M. intracellulare*, 194 *M. xenopi*, et 109 *M. kansasii*, considérées comme responsables d'infection, isolées de 2006 à 2011. La notion d'un antécédent de traitement a été relevée prospectivement. La sensibilité aux principaux antibiotiques utilisés en thérapeutique a été mesurée et la prévalence des résistances a été évaluée pour les cas sans antécédent (R-I<sup>aire</sup>) ou avec antécédent (R-II<sup>aire</sup>) de traitement. Pour *M. avium* complex (MAC), aucune R-I<sup>aire</sup> n'a été trouvée, mais la prévalence de la R-II<sup>aire</sup> à la clarithromycine et à l'amikacine était respectivement de 32% et 8% pour *M. avium*, et de 6% et 0% pour *M. intracellulare*. Pour *M. xenopi*, aucune résistance à la moxifloxacine n'a été détectée, mais une R-II<sup>aire</sup> à la clarithromycine a été observée pour 7% des souches. Enfin, pour *M. kansasii*, aucune résistance à la clarithromycine, la moxifloxacine ou la rifampicine n'a été détectée.

En conclusion, nous avons pu conclure que : (a) aucun cas de R-I<sup>aire</sup> n'a été détecté chez les MNT-CL, ce qui est logique puisqu'il n'y a pas de transmission croisée par ces espèces environnementales. Cela permet, en l'absence d'antécédents de traitement, d'instituer un traitement sans test de sensibilité, sur la base du profil naturel de sensibilité propre à l'espèce ; les tests de sensibilité devraient donc être réservés aux cas d'échecs ou de rechute. (b) La R-II<sup>aire</sup> existe pour MAC et *M. xenopi* mais pas pour *M. kansasii*. Sur la base de cette constatation, les traitements disponibles peuvent être considérés comme satisfaisants pour *M. kansasii* mais pas pour MAC ni pour *M. xenopi*.

#### **Approche moléculaire**

Nous avons complété le travail décrit précédemment par la caractérisation moléculaire des souches de MAC et de *M. xenopi* intermédiaires ou résistantes à la clarithromycine (par le séquençage des positions 2058 et 2059 du gène *rrl* codant pour l'ARNr 23S), des souches de MAC résistantes à l'amikacine (par le séquençage de la position 1408 du gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S), ainsi que quelques souches sensibles « témoins » pour ces deux groupes. Ainsi nous avons montré que pour ce panel :

- les souches de MAC intermédiaires ou sensibles à la clarithromycine étaient toujours sauvages dans *rrl*,
- les souches de MAC résistantes à la clarithromycine étaient mutées dans *rrl* dans 84% des cas,
- les souches de *M. xenopi* résistantes à la clarithromycine étaient mutées dans *rrl* dans 50% des cas,
- les souches de MAC dont la CMI de l'amikacine est supérieure à 64 µg/ml sont toujours mutées dans *rrs*,
- les souches de MAC dont la CMI de l'amikacine est inférieure ou égale à 64 µg/ml sont toujours sauvages dans *rrs*.



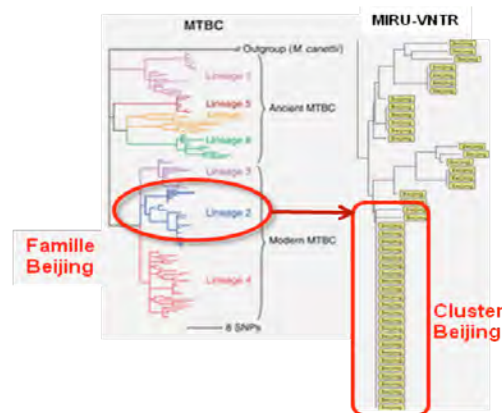
#### 6.1.4. Etude génotypique des mycobactéries

##### Mise au point d'un protocole d'étude standardisée des génomes entiers

Nous avons mis au point un protocole standardisé d'extraction, de qualification de l'ADN génomique, et de séquençage de génomes entiers des mycobactéries sur des plateformes partenaires. Ce projet pilote a été mené sur une souche de *M. abscessus*, et le travail a fait l'objet d'une publication (Pang *et al.*, Genome Announc. 2013).

#### 6.1.5. Diffusion de la tuberculose multi-résistante en France : développement d'une stratégie génomique pour comprendre le succès de la lignée Beijing

En Asie, en Amérique du Nord et en Europe, une part importante des souches MDR de *M.tuberculosis* appartient à la famille « Beijing ». Cette famille a été impliquée dans de nombreuses épidémies et est connue pour sa plus forte virulence dans les modèles animaux. Les causes de sa plus grande virulence et de sa capacité à acquérir des résistances ne sont pas encore élucidées mais sont probablement associées à des changements évolutifs dans le génome (délétions, insertions, mutations ponctuelles) susceptibles de conférer une plus haute valeur sélective. Depuis 2006, le CNR caractérise les souches MDR circulant en France par une approche phylogénétique (MIRU-VNTR 24 loci). Deux résultats frappants sont à noter à partir de cette analyse : (1) la très nette prédominance des souches « Beijing » observée en 2013 par le CNR-MyrMA (49% en 2013), qui est associée à une augmentation constante depuis le début de l'étude de la proportion annuelle des souches Beijing (de 19% en 2006 à 49% en 2013) (voir Tableau 29), et (2) l'existence pour la lignée Beijing de deux clusters majoritaires de souches partageant des spoligotypes et des codes MIRU-VNTR identiques, ces 2 clusters représentant en 2013 76% des souches Beijing MDR. Une analyse épidémiologique poussée des souches incluses dans ces clusters indique qu'il existe à ce jour peu de liens épidémiologiques directs entre ces souches, ce qui suggère qu'elles ont fait l'objet d'une diffusion efficace à l'échelle de l'Europe avant d'atteindre la France.



**Figure 11. Dendrogramme MIRU-VNTR 24 loci d'un cluster majoritaire parmi les souches MDR Beijing**

Ces observations nous ont amené à faire deux hypothèses : (i) des clones Beijing adaptés à une diffusion rapide dans la population pourraient circuler en Europe et seraient introduits en France par l'intermédiaire de patients non originaires de France, en particulier des pays de l'ex-Union Soviétique, et (ii) les méthodes actuelles utilisées pour suivre la propagation des souches Beijing ne sont pas optimales et doivent être améliorées.

Sur la base de ces hypothèses, nous avons mis en place un programme de recherche visant à réaliser une analyse exhaustive des caractéristiques moléculaires des deux clusters majoritaires des souches Beijing circulant en France, avec pour objectif final de développer de nouveaux marqueurs permettant un suivi plus performant de



la diffusion de ces clones dans la population. Dans un premier temps, nous avons mis en place au CNR les capacités de séquençage génomique sur plateformes Illumina MySeq, HiSeq et Roche GS-junior, afin de réaliser l'analyse complète du génome d'un échantillon de 11 souches Beijing MDR appartenant aux 2 clusters majoritaires, ainsi que de 5 souches Beijing non groupées (singletons). Les premiers génomes complets (4,6 Mbases par génome) ont été obtenus en 2013 et sont actuellement en cours d'analyse. Les résultats préliminaires de cette analyse génomique confirment l'existence de deux larges clusters parmi les souches MDR de la famille Beijing, mais permettent de subdiviser ces clusters en branches distinctes à partir de l'analyse comparative des SNPs (single nucleotide polymorphisms) détectés entre les souches (cf Figure XX).

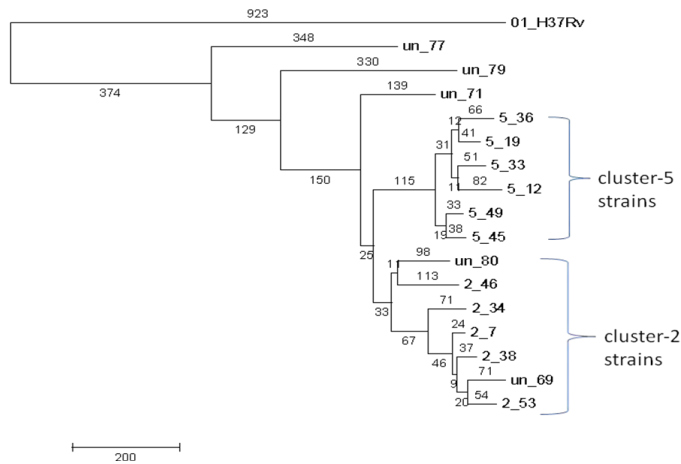


Figure 12. Dendrogramme établi pour un échantillon de souches MDR Beijing à partir de l'analyse des SNPs détectés dans le génome complet des souches.



## 6.2 Publications et communications

### 6.2.1. Publications nationales

1. A. Renvoisé, F. Brossier, W. Sougakoff, V. Jarlier, A. Aubry. Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology? *Med Mal Infect.* **2013** ; 43(8):322-30
2. N. Veziris. Les nouveaux antituberculeux (1) : nouvelles utilisations de molécules existantes. 2013. Volume 15, Issue 2, Pages 95-101
3. N. Veziris. Les nouveaux antituberculeux (2) : nouvelles molécules *Journal des Anti-infectieux*, 2013. Volume 15, Issue 3, Pages 133-140

### 6.2.2. Publications internationales

1. C. Gomez, P. Ponien, N. Serradji, A. Lamouri, A. Pantel, E. Capton, V. Jarlier, G. Anquetin, A. Aubry. Synthesis of gatifloxacin derivatives and their biological activities against *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2013 ; 15;21(4) : 948-56.
2. A. Bouige, A. Darmon, J. Piton, M. Roué, S. Petrella, E. Capton, P. Forterre, A. Aubry\*, Mayer C\*. The *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase possesses two functional GyrA-boxes. **Biochem J.** 2013; 455(3) : 285-94 (\*co-derniers auteures)
3. A. Fillion, A. Aubry, F. Brossier, A. Chauffour, V. Jarlier, N. Veziris. Impact of Fluoroquinolone Resistance on Bactericidal and Sterilizing Activity of a Moxifloxacin-Containing Regimen in Murine Tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother.** 2013 ; 4496-500.
4. A. Agrawal, M. Roué, C. Spitzfaden, S. Petrella, A. Aubry, MM. Hann, B. Bax, C. Mayer. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase ATPase domain structures suggest a dissociative mechanism that explains how ATP hydrolysis is coupled to domain motion. **Biochem J.** 2013; 456(2) : 263-73
5. N. Veziris, A. Chauffour, S. Escolano, M. Matsuoka, V. Jarlier, A. Aubry. Resistance of *Mycobacterium leprae* to quinolones: a question of relativity?" **PLOS Neglected Tropical Diseases.** 2013 ; 7(11) : e2559
6. Mechaï F, Veziris N, Aoun O, Bille E, Lecuit M, Brossier F, Viard JP, Lortholary O. In vivo selection of a multidrug-resistant *Mycobacterium avium* isolate in a patient with AIDS. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2013, 17(1):141-2.
7. Fillion A, Aubry A, Brossier F, Chauffour A, Jarlier V, Veziris N. Impact of Fluoroquinolone Resistance on Bactericidal and Sterilizing Activity of a Moxifloxacin-Containing Regimen in Murine Tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother** 2013, 57(9):4496-500.
8. Bernard C, Brossier F, Sougakoff W, Veziris N, Frechet-Jachym M, Metivier N, Renvoisé A, Robert J, Jarlier V, On Behalf Of The Mdr-Tb Management Group Of The Nrc C. A surge of MDR and XDR tuberculosis in France among patients born in the Former Soviet Union. **Euro Surveill.** 2013, 18(33):20555.
9. Pang S\*, Renvoisé\* A, Perret C, Guinier M, Chelghoum N, Brossier F, Capton E, Jarlier V, Sougakoff W. Whole-genome sequence of *Mycobacterium abscessus* clinical strain V06705. **Genome Announc.** 2013, 1(5). (\* equal contribution)
10. C. Bernard, C. Wichlacz, M. Rigoreau, S. Sorhouet, R. Dagiral, V. Jarlier, N. Veziris. Evaluation of the Module Fluo-RAL(R) for fluorescent microscopy detection of tuberculous and non tuberculous acid-fast bacilli. **J Clin Microbiol.** 2013,51(10) : 3469-70
11. Radomski N, Roguet A, Lucas FS, Veyrier FJ, Cambau E, Accrombessi H, Moilleron R, Behr MA, Moulin L. *atpE* gene as a new useful specific molecular target to quantify *Mycobacterium* in environmental samples. **BMC Microbiol.** 2013 Dec 3;13:277. doi: 10.1186/1471-2180-13-27
12. J. Robert, D. Affolabi, F. Awokou, D. Nolna, B. Adou P. Manouan, Y.B. Acho, M. Gninafon, A. Trebucq. 2013. Assessment of organizational measures to prevent nosocomial tuberculosis in health facilities of 4 sub-Saharan countries in 2010. **Infection control and hospital epidemiology** : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 34 (2) p. 190-5



13. T V Bui, V Meyssonier, P Y Boelle, D Che, D Antoine, V Jarlier, J Robert. Decrease in the incidence of culture-positive meningitis and cerebral tuberculomas in France from 1990 to 2007. 2013. **Epidemiology and infection** p. 1-7
14. Hilleman D, Hoffner S, Cirillo D, Drobniowski F., Richter E., Rusch-Gerdes S, The Baltic-Nordic TB-laboratory network, TB PAN-NET, ECDC ERLN-TB networks\* (E. Cambau, V. Jarlier). First evaluation after implementation of a quality control system for the second line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* joint efforts in low and high incidence countries. PLoS ONE 2013, 8(10):e76765.

### **6.2.3. Chapitres d'ouvrages**

1. P. Fraise, N. Veziris. Chapitre Tuberculose in La pneumologie fondée sur des Preuves. Editions Margaud-Orange. 2013
2. F. Mougari, L. Guglielmetti, A. Lopes, L. Raskine, E. Cambau. Mycobactérioses non tuberculeuses hors mycobactérioses cutanées. Revue Encyclopédie Médico Chirurgicale. 2013

### **6.2.4. Communications nationales**

1. M. Chazel, H. Marchandin, N. Keck, D. Terru, M. Ponsada, V. Jacomo, G. Panteix, N. Bouzinbi, P. Vande Perre, AL. Bañuls, M. Choisy, A. Aubry, S. Godreuil. Evaluation of SLOMYCO Sensititre® Panels for antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium marinum* isolates. **33<sup>ème</sup> Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse.** Paris. 2013
2. Micaëlo M, Brossier F, Luyt CE, Lu Q, Jarlier V, Aubry A. Comparison of Etest® and Disc diffusion method for carbapenem susceptibility testing against *Pseudomonas aeruginosa*. **33<sup>èmes</sup> Réunions Interdisciplinaires de Chimiothérapie Anti-Infectieuses,** Paris. 2013.
3. C. Bernard, N. Veziris, F. Brossier, A. Aubry, W. Sougakoff, V. Jarlier, J. Robert. Augmentation des cas de tuberculoses multirésistantes en provenance d'Europe de l'Est de 2006 à 2012. **14<sup>èmes</sup> Journées Nationales d'Infectiologie.** Clermont-Ferrand. 2013.
4. C. Bernard, N. Veziris, J. Robert, F. Brossier, A. Aubry, V. Jarlier, W. Sougakoff. Analyse des voies de migration et des cas groupés de tuberculose multirésistante en France grâce au génotypage. **14<sup>èmes</sup> Journées Nationales d'Infectiologie.** Clermont-Ferrand. 2013.
5. F.Mougari, L.Raskine,A.Ferroni, E.Marcon, I.Sermet-Gaudelus, B.Heym, JL.Gaillard, X.Nassif, E.Cambau. Place de la REP-PCR semi-automatisée pour l'analyse du complexe *Mycobacterium abscessus*. **9<sup>ème</sup> Congrès National de la Société Française de Microbiologie,** Lille, 8 février 2013
6. L. Guglielmetti, J. Robert, D. Le Dû, M. Fréchet-Jachym, D. Martin, N. Métivier. Efficacité microbiologique et tolérance de la bédaciline (TMC207) dans le traitement de la tuberculose multirésistante (MDR) et ultrarésistante (XDR). **33<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse.** Paris, 21-22 novembre 2013.
7. S. Mzalouat, L. Batrin, C. Wichlacz, G. Millot, C. Sola, W. Sougakoff, G. Refrégier. Loci mini satellites et génotypage du complexe Loci mini-satellites et génotypage du complexe *Mycobacterium avium* intracellulaire (MAC) *Mycobacterium avium*-intracellulaire (MAC). **3<sup>ème</sup> Conférence du Mycoclub.** Toulouse. 2013
8. A. Darmon, A. Bouige, J. Piton, M. Roué, S. Petrella, E. Capton, P. Forterre, C. Mayer, A. Aubry. The *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase possesses two functional GyrA-boxes. **3<sup>ème</sup> Conférence du Mycoclub.** Toulouse. 2013
9. C. Bernard, A. Aubry, V. Jarlier, N. Veziris. Emergence of Fluoroquinolone resistance: an example of biological complexity. **3<sup>ème</sup> Conférence du Mycoclub.** Toulouse. 2013

### **6.2.5. Communications internationales**

1. A. Aubry, A. Chauffour, S. Escolano, V. Jarlier, N. Veziris Resistance of *Mycobacterium leprae* to quinolones: a question of relativity? **23<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,** 2013
2. C. Bernard, A. Aubry, V. Jarlier, N. Veziris. Emergence of Fluoroquinolone resistance: an example of biological complexity. Keystone Symposia "Tuberculosis: Understanding the Enemy", 2013



3. Kramkimel N, Franck N, Brossier F, Coignard S, Heym B, Carlotti A, Schmitt A, Gaillard JL, Dousset B, Dupin N, Poyart C, Morand PC. Disseminated cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection following catheter-borne bacteraemia. **23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2013.
4. Brossier F, Pham A, Bernard C, Veziris N, Jarlier V, Sougakoff W. Investigation of resistance to aminoglycosides/cyclic peptide in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **53<sup>rd</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013.
5. Pang S, Renvoisé A, Perret C, Guinier M, Chelghoum N, Brossier F, Capton E, Jarlier V, Sougakoff W. Whole genome sequencing (WGS) of a *Mycobacterium abscessus* clinical isolate for evaluating the contribution of the WGS approach to epidemiology, strain identification and detection of acquired clarithromycin resistance in *M. abscessus* infections. **10<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM)**, 2013.
6. N Veziris, D. Hoff, V. Gruppo, S. Irwin, A. Lenaerts. Early Bactericidal Activity of Antituberculous Drugs in a Murine Model. **Keystone Symposia "Tuberculosis: Understanding the Enemy"**, 2013
7. C. Andrejak, O. Peuchant, N. Veziris, C. Segonds, D. Terru, F. Hamdad, A. Lagrange, V. Lalande, C. Laurain, P. Bemer. Outcome and prognostic factors of nontuberculous mycobacteriosis in France: a cohort study of 192 patients. **23rd Annual Congress of the European Respiratory Society**. 2013
8. Mougari F., Crockett F., Chau F., Raskine L., Bouziane F., Veziris N., Cambau E. Selection of resistance to clarithromycin with regard to the subspecies in *Mycobacterium abscessus*. **23<sup>rd</sup> ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)**, Berlin, 27-30 Avril 2013.
9. L. Guglielmetti, J. Robert, D. Le Dû, M. Fréchet-Jachym, D. Martin, N. Métivier. Microbiological efficacy and safety profile of Bedaquilline (TMC207) in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: interim analysis of a cohort of MDR/XDR patients. **44th world conference on lung health**. Paris, 30 octobre-3 novembre 2013.

## **6.2.6. Conférences sur invitation nationales**

### **Christine BERNARD**

1. C. Bernard, Les tuberculoses multirésistantes ; Congrès francophone Pédiatrique de Pneumologie et d'Allergologie, Paris 2013
2. C. Bernard, Tuberculoses multirésistantes et ultrarésistantes en France ; réunion d'Automne des CLAT, Créteil 2013

### **Emmanuelle Cambau**

1. E. Cambau. Outils diagnostiques de la résistance aux antituberculeux (pratique actuelle et perspectives). Journée DGS/InVS/CNR pour la journée mondiale de la tuberculose (10 avril 2013)
2. E. Cambau. Lèpre : quoi de neuf dans le diagnostic et la résistance aux antibiotiques ? 14eme journées nationales d'infectiologie, Clermont-Ferrand (Juin 2013).
3. E. Cambau. Epidémies de mycobactérioses liées à l'eau. Journée thématique de la Société Française de Microbiologie « Microbes et eau » (octobre 2013)
4. E. Cambau. Résistance aux anti-lépreux : comment la détecter et la surveiller ? Congrès de la Société de Pathologie exotique (décembre 2013).
5. E. Cambau. interview Magazine de la santé TV5 25 janvier 2013 « la lèpre, son diagnostic et sa prise en charge dans le monde, ainsi que le rôle des associations »

### **Vincent JARLIER**

1. Académie de Médecine 19 février 2013 : tuberculose MDR
2. Congrès Médecine tropicale, Pharo, Marseille, 16 septembre 2013 : tuberculose MDR

### **Jérôme ROBERT**

1. Tuberculose : résistance et multirésistance aux antituberculeux en France ; In : « Session ONERBA : Infections à Mycobactéries : quoi de neuf ? ». 14ème Journées Nationales d'Infectiologie. Clermont-Ferrand, 12-14 juin 2013.





2. Epidémiologie de la résistance aux antituberculeux en France ; In : « Atelier FMC : Tuberculose : ne pas contribuer à l'émergence de la résistance ». 33<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 21-22 novembre 2013

#### **Nicolas VEZIRIS**

1. Veziris N, Tritar F. Gestion de Patients Porteurs de Tuberculose Multirésistante (TB-MR). 1<sup>ères</sup> journées du GREPI. 2013
2. Veziris N. Tuberculose R, MDR, XDR : épidémiologie, Apport du diagnostic moléculaire. Cours d'automne en Chimiothérapie et Vaccinologie. Veyrier-du-Lac. 2013.
3. Veziris N. Prise en charge de la tuberculose, les astuces pour ne pas contribuer à l'émergence des résistances : le diagnostic des résistances. 32<sup>ème</sup> Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2013
4. N. Veziris, C. Bernard, F. Brossier, A. Aubry, J. Robert. Tuberculose à bacilles ultrarésistants. 32<sup>ème</sup> Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2013

### **6.2.7. Conférences sur invitation internationales**

#### **Alexandra AUBRY**

Action and mechanisms of resistance involving nucleic acid synthesis in mycobacteria, ESCMID Postgraduate education course "Gaining expertise on mycobacterial infections" (May 2013, Paris)

#### **Emmanuelle CAMBAU**

1. E. Cambau. Antibiotic susceptibility of nontuberculous mycobacteria. ESCMID Postgraduate education course "Gaining expertise on mycobacterial infections" (May 2013, Paris)
2. E. Cambau. Antibiotic susceptibility in leprosy. ESCMID Postgraduate education course (May 2013, Paris): gaining expertise on mycobacterial infections.
3. E. Cambau. The world of non-tuberculous mycobacteria. Educational Workshop 13 at ECCMID 2013, Berlin.
4. E. Cambau. Breakpoints for mycobacteria: problems and solution. ECCMID 2013, Berlin.
5. E. Cambau (on behalf of European Study group on TB eXist). New method for second line drug susceptibility testing using TB eXist. European Society for Mycobacteriology, Firenze Juillet 2013
6. E. Cambau. « Improving chemotherapy for leprosy », Sommet international de l'OMS sur la Lèpre. Bangkok 25 juillet 2013

#### **Jérôme ROBERT**

How to implement tuberculosis surveillance at a country level ESCMID Postgraduate education course "Gaining expertise on mycobacterial infections" (May 2013, Paris)

#### **Vincent JARLIER**

1. Pasteur Paris, Tuberculosis course, 24 juin 2013: Evaluation of new antituberculous agent
2. New antituberculous agents. ESCMID Postgraduate education course "Gaining expertise on mycobacterial infections" (May 2013, Paris)

#### **Wladimir SOUGAKOFF**

1. Action and Mechanisms of resistance involving mycolic acid synthesis. ESCMID Postgraduate education course "Gaining expertise on mycobacterial infections" (May 2013, Paris)
2. 6<sup>th</sup> Annual GABRIEL Network meeting, Fondation Mérieux, December 10-13th 2013. Molecular surveillance of TB in France: what's the next step?



## 7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire et environnementaux

### 7.1. Santé animale

Nous connaissons depuis longtemps nos collègues des laboratoires en santé animale de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, du Muséum Nationale d'Histoire Naturelle – Ménagerie du Jardin des Plantes, du Service Vétérinaire du Zoo du Bois de Vincennes et du Laboratoire de mycobactériologie animale de l'AFFSA (Maisons-Alfort) en particulier les Drs Alexis LECU et Maria-Laura BOSCHIROL

Nous collaborons avec eux lorsque se pose une question sur les liens potentiels entre la tuberculose humaine et animale, par exemple à la demande des autorités sanitaires, ou lors d'un évènement ponctuel, ou encore pour prêter notre concours lorsqu'une souche de mycobactérie d'origine animale est d'identification difficile.

Le CNR-MyRMA procède régulièrement à la surveillance de la tuberculose à *M.bovis* à travers les réseaux AZAY-mycobactéries et CNR-MyRMA comme nous l'avons fait dans le passé (ex . Robert, Int. J. Tuberc. Lung Dis. 1999 ; **8** : 711-714). Nous avons recensé au travers du réseau AZAY-mycobactéries des CHU 28 cas en 2013 (cf section 3.1.4.), qui représentaient à peine 2% de l'ensemble des 1530 cas de tuberculose bactériologiquement confirmés cette même année dans les 37 laboratoires de ce réseau. (**Tableau 24**). Ces chiffres montrent que *M.bovis* représente un danger très limité en santé humaine dans notre pays.

De manière intéressante, comparativement au cas de tuberculose non dus à *M.bovis*, ceux à *M.bovis* étaient moins souvent des hommes (45 vs. 65%,  $p<0,01$ ), plus souvent nés au Maghreb (55 vs 14%,  $p<0,01$ ) et plus souvent de forme extrapulmonaire (66 vs. 37%). Il n'y avait pas de différence significative entre les cas de tuberculose à *M. bovis* et les autres cas pour l'âge et les antécédents de traitement antituberculeux.

Nous participons aux réunions communes avec les vétérinaires et les responsables de l'assurance médicale des éleveurs (MSA) pour les conseils et les investigations à mener (i) d'une part pour la prévention des cas de tuberculose à *M. bovis* pouvant survenir chez les éleveurs, (ii) d'autre part sur les épidémies de tuberculose bovine détectées dans les élevages et dans les animaux sauvages.

De manière plus ciblée, nous avons fait partie en 2013 du « groupe d'expertise collective d'urgence concernant la saisine 2013-SA-0029 » Il s'agissait d'évaluer le risque de transmission de la tuberculose à partir de deux éléphants du parc de la Tête d'Or à Lyon qui étaient restés plusieurs mois dans le même enclos qu'un éléphant malade.

### 7.2. Environnement

Le risque de contracter une infection à mycobactéries dites « atypiques » à partir de l'environnement est bien connu, lors d'activités de loisir (baignade, hydrothérapie, aquariophilie) mais aussi de soins (mésothérapie, chirurgie).

Nos activités dans ce domaine se déroulent dans 2 axes, les développements techniques et l'expertise lors d'évènements précis.

#### 7.2.1. Développements techniques

Nous étudions depuis une dizaine d'années les techniques de détection des mycobactéries dans l'environnement, en particulier les eaux de réseau potable et les eaux naturelles, en collaboration avec le LEESU (Laboratoire Eau-Environnement des Systèmes Urbains) de l'Université Paris 12 (Françoise Lucas), le Centre de recherche d'expertise et de contrôle des Eaux de Paris (Laurent Moulin, Sophie Haenn) dans le cadre du Programme PIRENSEINE (Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine). Depuis 2012, nous



collaborons aussi avec le laboratoire du Pr Yann Héchard à l'Université de Poitiers, sur les interactions entre les mycobactéries et les amibes dans les eaux naturelles.

Nous avons mis au point plusieurs méthodes de détection des mycobactéries dans les eaux (de réseau et naturelles) : une méthode phénotypique avec filtration, concentration et culture (Radomski Appl Environ Microbiol 2010a), une méthode de PCR temps réel d'une région du gène codant l'ARN16S commune aux mycobactéries mais spécifique par rapport aux autres bactéries (Radomski et al Appl Environ Microbiol 2010b et 2011) et du gène *atpE*, spécifique des mycobactéries (Radomski, BMC microbiol, 2013).

Ces méthodes sont fiables pour l'étude :

a) des eaux propres : concentration des bactéries par filtration, culture sans décontamination préalable sur milieux contenant des antibiotiques,

b) des eaux sales : concentration des bactéries par centrifugation, décontamination par la soude, culture sur milieux contenant des antibiotiques et des antifongiques à forte concentration.

Ces deux méthodes peuvent être appliquées à la recherche de mycobactéries dans l'eau de réseau lors d'épidémie d'infection cutanée.

### **7.2.2. Expertise lors d'évènements**

Nous participons aux enquêtes menées par les autorités sanitaires (ARS) et les CCLIN (si évènement nosocomial) lors d'évènements d'infections à mycobactéries atypiques suspects d'être d'origine environnementale.

C'est ainsi qu'en 2013 (cf section 4.2.) nous avons participé aux enquêtes suivantes :

- infection cutanée à *M. massiliense* après mésothérapie (Dijon, Novembre 2013)
- infection cutanée à *M. bolletii* chez un patient immunodéprimé (octobre 2013)
- infection cutanée à *M. marinum* chez une patiente immunodéprimée ayant eu des soins en piscine d'eau de mer (Caen, juillet 2013)
- infection d'une prothèse mammaire à *M. fortuitum* (La Réunion, juillet 2013).

### **7.2.3. Evaluation de risque pour des agences de santé**

Nous avons été auditionnée à l'HAS (décembre 2013) au sujet de l'évaluation des risques liés aux pratiques de mésothérapie à visée esthétique et avons participé aux réunions de la HAS sur le risque infectieux lié aux prélèvements post-portem pour les transplantations d'organe

## **7.3. Alimentation**

L'alimentation n'a pas été jusqu'à présent impliquée dans la survenue d'infections à mycobactéries, ni dans les chaînes de transmission, sauf bien entendu dans la tuberculose à *M.bovis* (consommation de lait contaminé cru). Nous n'avons pas été jusqu'à ce jour impliqué dans la recherche de *M.bovis* dans la chaîne alimentaire.



## 8. Programme d'activité 2014 - 2015

### 8.1. Développement et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic

#### 8.1.1. Nouvelle méthode d'étude de la sensibilité de *M. tuberculosis* vis-à-vis des antituberculeux de première et seconde ligne

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

Cette nouvelle méthode a été évaluée par une étude multicentrique, initiée par le CNR-MyRMA (Emmanuelle Cambau) et le CNR des mycobactéries de Suisse (Pr Erik Boettger) et la firme Becton-Dickinson, et impliquant plusieurs laboratoires européens spécialisés dans l'étude des mycobactéries (Belgique, Portugal, Italie, Allemagne, Espagne, Pays-bas, Suède). L'étude a rassemblé les résultats de sensibilité et de résistance pour des souches MDR isolées en 2009 et 2010. Les tests de sensibilité étaient faits selon un protocole standardisé (mêmes concentrations d'antibiotiques, mêmes antibiotiques testés, mêmes inoculums de *M. tuberculosis*) et les résultats phénotypiques ont été comparés aux génotypes de résistance déterminés dans chaque centre. Plusieurs réunions du comité de pilotage (E. Cambau, E. Bottger, M. Viveiros) ont eu lieu depuis le début de l'étude dont 2 réunions en 2013.

Globalement, 139 souches MDR ont été étudiées par ce protocole. Un premier antibiogramme teste la croissance des souches de *M. tuberculosis* à des concentrations critiques, choisies pour leur pertinence de détection des souches résistantes, pour les 13 antituberculeux suivants: isoniazide, rifampicine, rifabutine, ethionamide, streptomycine, amikacine, capréomycine, pyrazinamide, PAS, ofloxacine, moxifloxacine, et linézolid. Trois inoculums sont testés en parallèle : 100%, 10% et 1% de l'inoculum pour la croissance en présence d'antibiotique. La croissance est suivie en temps réel par le système TbeXist. Les souches ne poussant pas à la concentration critique avant la croissance du témoin 1% sont dites sensibles à cet antituberculeux. Les souches poussant à cette concentration avant ou en même temps que le témoin 1%, sont dites résistantes. Seuls ces antibiotiques sont alors testés en système dit de détermination « quantitative » de la résistance, c'est-à-dire à plusieurs concentrations croissantes par antibiotiques.

Les résultats des 9 centres ont été colligés par E. Cambau et une version préliminaire a été présentée lors du congrès de l'European Society for Mycobacteriology en juillet 2013. Les résultats seront détaillés dans le rapport 2014 et soumis à publication en 2014.

Nous allons en 2014 et 2015 appliquer prospectivement cette méthode à plusieurs souches résistantes à l'isoniazide ou à la rifampicine, tout en comparant les résultats à la méthode de référence que nous utilisons de proportion en milieu solide LJ.



### **8.1.2. Identification des mycobactéries atypiques de l'espèce *M. abscessus* par spectrométrie de masse MALDI-ToF**

Nous avons initié en 2013 une collaboration avec le laboratoire de Bactériologie du CHU de Brest pour améliorer l'identification des mycobactéries de l'espèce *M. abscessus* par spectrométrie de masse MALDI-ToF. L'objectif est (1) de différencier *M. abscessus* des autres mycobactéries à croissance rapide, en particulier de *M. chelonae* car les séquences ribosomales sont identiques entre ces deux espèces, et (2) de déterminer les sous espèces d'importance clinique individualisées au sein de *M. abscessus* comme *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* et *M. abscessus* subsp. *abscessus*.

Les souches étudiées sont d'une part des souches isolées de patients atteints de mucoviscidose et suivis dans différents CHU dont celui de Brest, d'autre part une partie des souches étudiées par le CNR-MyRMA précédemment pour les mécanismes de résistance à la clarithromycine (Bastian et al. 2011). Les résultats seront disponibles en 2014.

## **8.2. Activités de Surveillance**

### **8.2.1. Tuberculose**

La surveillance des principaux aspects de la tuberculose sera poursuivie, au travers (a) des souches reçues au CNR-MyRMA, accompagnées de renseignements cliniques et épidémiologique, (b) du recueil organisé par le CNR-MyRMA au sein des 2 réseaux qu'il anime : réseau AZAY-mycobactéries et réseau CNR-MyRMA.

Les principaux aspects de surveillance et méthodologies afférentes seront les suivants :

#### **Protocole de recherche clinique « méningites communautaires en France »**

Le CNR-MyRMA (Emmanuelle Cambau) continuera à participer au travail « Cohorte nationale observationnelle des méningites bactériennes communautaires de l'adulte » (PHRC régional, responsable Xavier Duval, hôpital Bichat) qui recense les méningites bactériennes en France chez l'adulte et évalue leur évolution.

#### **Conception d'un registre de suivi des tuberculoses multirésistantes en France**

L'objectif est de suivre et documenter le devenir des personnes atteintes de tuberculose à bacilles multirésistants (TB MDR) en France pour améliorer les missions de conseil en antibiothérapie lors des réunions du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » du CNR MyRMA. Ce projet a été initié fin 2012v avec le concours de la DGS (cf résultats 2013).

Après la rédaction du cahier des charges et l'appel d'offre pour la réalisation du logiciel informatique lancé fin 2013, un industriel a répondu positivement. Nous engagerons le travail avec lui en 2014 pour analyser les caractéristiques du produit proposé. Un financement complémentaire sera nécessaire car la proposition financière est plus élevée que le budget prévu par la DGS.

### **8.2.2. Lèpre**

Nous continuerons à analyser les prélèvements de patients résidant en France et suspects de lèpre.

Nous poursuivrons le **programme spécifique** d'appuis au diagnostic bactériologique des cas de lèpre (microscopie et tests moléculaires d'identification de *M. leprae* et de résistance aux antiléproux : dapsonne, rifampicine, quinolones) diagnostiqués cliniquement à **Mayotte** en collaboration avec l'ARS et le dispensaire de



léprologie de Mamoudzou (responsable Dr Anne-Marie de Montera, Médecin léprologue Dr Dalila Mohand-Oussaid). Nous tenterons de l'étendre à l'île d'Anjouan, toute proche de Mayotte, dont les émigrés constituent une population à haut risque à Mayotte.

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

### Formation nationale

Comme chaque année nous recevons des stagiaires techniciens ou biologistes qui en feront la demande et des étudiants en BTS, Licences et Masters.

### Formation internationale lors de cours et congrès en 2014

Lors du congrès de l'ESCMID en mai 2014 (ECCMID 2014, Barcelona) une session de formation continue (Workshop) est consacrée à la mycobactériologie (organisée par E. Cambau) et comprendra cette année une présentation sur les infections survenant dans les pays à faible revenus : tuberculose, lèpre et ulcère de Buruli.

### Conseils thérapeutiques

En raison de l'augmentation du nombre de cas de tuberculose MDR et XDR (cf sections 2 et 3) l'activité de conseil telle qu'actuellement structurée au sein du « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » (14 réunions en 2014, cf section 5.3.) ne permet plus d'y présenter tous les dossiers. En conséquence des dossiers font l'objet de conseils donnés directement par un membre du Groupe thérapeutique, le plus souvent un membre du CNR-MyRMA. Il s'agit principalement des cas les plus simples pour lesquels des conseils sont donnés par téléphone ou mail par Nicolas Veziris ou Christine Bernard (cf liste des membres du CNR-MyRMA en annexe 1)

La mise en place du registre (cf section 3.1.3. et 8.2.1.) devrait permettre à l'avenir de simplifier la gestion des cas MDR-XDR et ainsi accroître le nombre de dossiers présentés.

Dans l'intervalle nous proposons de comptabiliser et tracer les dossiers discutés en dehors des réunions du Groupe thérapeutique

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

### 8.4.1. Compréhension des mécanismes de la résistance de *M. tuberculosis* aux fluoroquinolones

#### - Corrélation génotype/niveau de résistance aux fluoroquinolones

Nous avons initié une étude visant à comparer les performances diagnostiques de la mesure de la sensibilité aux fluoroquinolones par méthodes génotypiques et phénotypiques dans un modèle murin de la tuberculose. Afin de corréler le génotype et le niveau de résistance aux fluoroquinolones, les concentrations minimales inhibitrices de différentes fluoroquinolones seront déterminées vis-à-vis de souches résistantes aux fluoroquinolones (avec ou sans mutation dans *gyrA* ou *gyrB*). Une meilleure compréhension du lien niveau de résistance/génotype permettra d'améliorer l'utilisation des outils moléculaires pour affiner le diagnostic de la résistance et les recommandations thérapeutiques qui peuvent en découler.

#### - Recherche de nouveaux mécanismes de résistance aux FQ grâce aux techniques de séquençage complet du génome.

Nous avons constitué une banque de souches isogéniques à partir de *M. tuberculosis* H37Rv résistantes aux quinolones sans mutation dans l'ADN gyrase. Nous poursuivons le séquençage complet de souches résistantes aux quinolones sans mutations dans l'ADN gyrase initié en collaboration avec le Dr T. Joerges (Department of Computer Science Texas A&M University) afin d'identifier des SNPs qui pourraient nous orienter vers de nouveaux mécanismes de résistance aux fluoroquinolones.



### **8.4.2. Etude de l'activité *in vivo* des fluoroquinolones sur des souches présentant des mutations de l'ADN gyrase**

Pour les fluoroquinolones, dont les mutations dans l'ADN gyrase sont à ce jour l'unique mécanisme de résistance décrit chez *M. tuberculosis* complex, toutes les mutations n'entraînent pas le même niveau de résistance, avec parfois la conservation de l'efficacité de certaines fluoroquinolones. Le diagnostic génotypique de la résistance aux antituberculeux aboutira au remplacement progressif du diagnostic phénotypique, la détermination de l'impact *in vivo* des mutations sur l'activité des fluoroquinolones paraît donc indispensable. Nos précédents travaux montrant une efficacité résiduelle de la moxifloxacine envers certains mutants résistants, étant très encourageants, nous souhaitons maintenant évaluer la lévofloxacine dans cette situation. Son utilisation apporterait un véritable avantage pharmacocinétique par rapport à la moxifloxacine avec la possibilité d'augmenter les doses administrées (permettant de restaurer la sensibilité des mutants résistants) en conservant une bonne tolérance.

Notre **objectif** sera de montrer : (i) quelle est la meilleure fluoroquinolone à utiliser (moxifloxacine ou lévofloxacine ?) pour traiter les TB MDR résistantes aux fluoroquinolones et XDR, et (ii) pour quelle mutation/niveau de sensibilité l'utilisation d'une fluoroquinolone est-elle bénéfique ?

**Méthodes** : A partir d'une banque de mutants les plus fréquemment retrouvés en pratique clinique, nous évaluerons *in vivo* dans un modèle murin quelles sont les fluoroquinolones les plus actives en monothérapie (la moxifloxacine ou la lévofloxacine). Les critères de jugement seront la survie des animaux traités et la charge bactérienne pulmonaire en fin de traitement. Cette activité *in vivo* sera corrélée au génotype ainsi qu'à la mesure de l'activité *in vitro*.

**Résultats attendus** : Cette approche originale et complète de recherche nous permettra de produire d'importantes données directement utilisables en clinique. Elles permettront l'application d'un traitement rapide et ciblé sur le génotype des TB MDR et XDR, essentiel pour une lutte antituberculeuse efficace.

### **8.4.3. Etude structurale et fonctionnelle des ADN gyrase de *M.tuberculosis* et *M. leprae***

La sous unité GyrA de l'ADN gyrase (GyrA<sub>2</sub>GyrB<sub>2</sub>) contient le domaine de liaison-coupe (DLC) et le domaine carboxy-terminal (CTD), alors que GyrB contient les domaines de l'ATPase et le domaine TOPRIM. TOPRIM et DLC interagissent pour former le site catalytique où se lie l'ADN et les quinolones. Nous avons récemment résolu la structure cristallographique du site catalytique de l'ADN gyrase *M. tuberculosis*. Nous voulons améliorer la qualité du modèle de ce site catalytique et déterminant la structure du complexe ternaire site catalytique-ADN-quinolone par cristallographie aux rayons X. Ceci permettra d'élucider le rôle de nouvelles mutations dont l'implication dans la résistance aux quinolones est inconnue (une construction basée sur des gènes fusionnés sera un atout pour atteindre cet objectif).

Pour mieux comprendre les mécanismes d'action des quinolones FQ et de fonctionnement des ADN mycobactériennes, nous utiliserons la technique dite « magnetic tweezers » qui permet d'étudier les interactions entre l'ADN et les protéines par micromanipulations de molécules isolées (en collaboration avec une équipe de biophysiciens de l'Ecole Normal Supérieure).

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

A la suite des résultats obtenus en 2013 (cf paragraphe 6.3 « Mécanisme de résistance acquise aux diarylquinolines chez *M. tuberculosis* : Etude de la structure de l'ATP synthase de *M.tuberculosis* »), nous poursuivrons l'étude de la structure 3D de l'ATP synthase en nous focalisant sur les sous-unités solubles (domaine catalytique non-transmembranaire) de l'enzyme. Pour cela, nous avons fait synthétiser des constructions plasmidiques optimisées pour l'expression de ses sous-unités chez *E.coli*. En utilisant ces constructions, nous exprimerons séparément les différentes sous-unités solubles du domaine catalytique et tenterons leur cristallisation en vue de déterminer les structures 3D correspondantes par cristallographie des protéines et diffraction des rayons X.



#### **8.4.5. Etude des mécanismes de résistance de *M. tuberculosis* au pyrazinamide**

Le tableau récapitulant les mutations caractérisées au CNR par séquençage du gène *pncA* dans le cadre de la détection de la résistance au PZA chez *M.tuberculosis* indique la très grande diversité des mutations rencontrées dans ce gène à partir d'isolats cliniques (cf Tableau 14). Cette diversité pose une question essentielle dans le cadre du diagnostic de la résistance au PZA par approche PCR-séquençage : la détection d'une mutation dans le gène *pncA* est-elle systématiquement corrélée à la résistance au pyrazinamide ? Les résultats préliminaires dont nous disposons indiquent clairement que certaines des mutations trouvées dans le gène *pncA* ne sont pas associées à la résistance.

A partir de ces données, nous développerons une nouvelle approche qui devrait permettre une détection rapide de la résistance au PZA sur la base d'une détection directe de l'activité pyrazinamidase à partir d'isolats cliniques. Dans cette approche, nous combinerons l'amplification par PCR du gène *pncA* à un système d'expression in vitro de la protéine PncA et mesure quantitative à haute sensibilité de l'activité pyrazinamidase par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette approche devrait permettre de déterminer en 24 heures le % d'inactivation de l'activité pyrazinamidase liée à la présence d'une mutation dans *pncA*, quelque soit le type de mutation.

#### **8.4.6. Approche génomique des populations de *M.tuberculosis* complex**

Nous poursuivrons le développement de l'épidémiologie génomique appliquée aux souches du complexe *M.tuberculosis* selon 3 axes.

##### **1. Comparaison des technologies de séquençage génomique**

Il existe à ce jour plusieurs plateformes de séquençage massif particulièrement adaptées à l'étude des génomes bactériens : le GS Junior de Roche et le MiSeq d'Illumina. Ces deux systèmes, qui s'appuient sur des principes de séquençage différents, fournissent des résultats sensiblement variables en termes de profondeur de séquençage (qui définit la fidélité de la lecture d'une base pour une position donnée) et d'assemblage des séquences (qui détermine la longueur des séquences obtenues après traitement des données brutes). En préambule au développement de l'étude génomique extensives des souches MDR de *M.tuberculosis* reçues au CNR, nous souhaitons évaluer comparativement les deux plateformes de séquençage génomique afin d'optimiser la qualité des données génomiques obtenues pour les mycobactéries. Cette étape de qualification technique est particulièrement importante dans le cadre de l'analyse des familles de souches qui présentent peu de divergence au niveau génomique, où dans des contextes d'analyse de chaînes de transmission où l'analyse des génomes requière une grande précision. Dans ce but, nous allons procéder au séquençage comparatif sur ces deux plateformes de deux ADN provenant d'une souche de *M. tuberculosis* (H37Rv) d'une part, et d'une souche de *M. bovis* (BCG) d'autre part. Cette étude permettra également de proposer une stratégie optimisée de séquençage génomique dans une perspective de diagnostic microbiologique (identification du résistome mycobactérien).

##### **2. Etude de souches de *M. tuberculosis* Beijing MDR**

Nous avons montré en 2013 (i) que les souches de la lignée Beijing sont prédominantes parmi les souches MDR, (ii) que leur proportion continue d'augmenter, et (iii) qu'il existe des souches regroupées en cluster de profil phylogénétique non différentiable sur la base du spoligotypage et du MIRU-VNTR, sans lien épidémiologique direct. Ces dernières pourraient donc correspondre à des souches à fort potentiel de transmission dans la population Européenne. Nous poursuivrons l'étude de ces souches en déterminant et en comparant les génomes complets d'une soixantaine d'entre elles, incluant une trentaine de souches MDR clusterisées (au sein des deux clusters majoritaires actuellement identifiés), une vingtaine de souches MDR non clusterisées et appariées par pays d'origine, et enfin 10 souches sensibles non clusterisées. Les données de séquençage seront traitées de façon à faire ressortir les régions de différence (plus particulièrement les SNPs) entre les souches étudiées. A partir des différences identifiées, nous développerons un outil de diagnostic couplé à une plateforme d'hybridation à haut débit (Luminex®) qui permettra une caractérisation rétrospective des souches collectées par le CNR, ainsi que la mise en place d'outils de routine plus performants pour la poursuite de la caractérisation des souches Beijing circulant en France et en Europe. Ces données devraient contribuer à mieux comprendre les dynamiques de transmission et d'émergence de la tuberculose multirésistante en France.





### 3. Etude d'une souche de BCG-MDR

Nous avons isolé dans le cadre de notre activité de CNR une souche de *M. bovis* BCG, de profil MDR (résistance à la rifampicine, à l'isoniazide à haut niveau, et à l'éthionamide). La multi-résistance chez *M. bovis* BCG étant exceptionnelle, nous allons réaliser le séquençage génomique de cette souche.

#### **8.4.7. Mise au point d'un modèle murin pour évaluer l'activité des antilépreux dans la prévention du passage de l'infection à la lèpre maladie (traitements dits « prophylactiques »)**

Des essais randomisés contre placebo ont tenté d'évaluer dans des pays d'endémie le bénéfice d'un traitement « prophylactique » chez les sujets contacts de patients lépreux : dose unique de rifampicine ou rifampicine-ofloxacine-minocycline, dapsone durant 7 mois à 3 ans (Reveiz, Pan Am J Public Health, 2009,26-341-9). La protection conférée par des traitements prophylactiques a été ~50% durant des périodes allant de quelques mois à 4 ans. L'étude COLEP (Feenstra, Lep Rev, 2012, 83 :292-304) a montré une protection par rifampicine de 57 % à 2 ans mais de seulement 28% à 6 ans. La protection conférée est donc nettement plus faible dans la lèpre que dans la tuberculose, peut-être à cause de réinfections à partir de patients contagieux non identifiés ou de l'activité insuffisamment stérilisante des traitements.

Comparativement à celui de la tuberculose, le traitement préventif de la lèpre pose des problèmes spécifiques : détection de l'infection à un stade précoce, connaissance insuffisante du passage de l'infection à la maladie, difficultés à mener des études cliniques en pays d'endémie (nombre élevé de sujets nécessaires, populations difficilement accessibles), absence de modèle expérimental permettant de tester les traitements.

Les modèles murins actuels d'infection lépreuse ne sont pas adéquats pour évaluer des traitements visant à empêcher le développement de la lèpre maladie. Notre **objectif est donc de mettre au point un modèle permettant spécifiquement d'évaluer des traitements visant à prévenir le développement de la lèpre maladie.**

En nous basant sur les connaissances des modèles murins (lignées, inoculum, courbes de croissance, possibilités d'évaluer la multiplication bactérienne, lésions), nous proposons de mettre au point un modèle dans lequel (a) la population bactérienne a atteint par multiplication une taille (~ $10^6$  afb dont ~ $10^5$  viables) équivalente à celle chez l'homme atteint de lèpre sub-clinique (Oskam, Lepr Rev, 2007, 78 :173-185) et (b) il est possible de juger du contrôle de l'infection.

Nous utiliserons des souris immunocompétentes (Swiss) et immunodéficientes (Nude) afin d'identifier le meilleur modèle.

Nous utiliserons pour chaque lignée 2 inocula différents ( $10^2$  et  $10^4$  bacilles par patte) et une durée d'incubation qui devrait permettre d'atteindre par multiplication active  $10^5$ - $10^6$  bacilles/patte (4 mois pour l'inoculum  $10^2$ , 6 mois pour  $10^4$ ),

- pour chacun des 4 groupes (2 lignées x 2 inocula), les souris seront randomisées en 4 lots au terme de la période d'incubation : témoin non traités, dose unique de rifampicine, de rifapentine ou de Bédaquiline,
- conservation des souris 12 mois après le traitement,
- souris sacrifiées tous les 2 mois pour dénombrement des bacilles par microscopie,
- pour chaque groupe pour lesquels il n'y aura pas eu de multiplication, les bacilles survivants en fin de traitement seront dénombrés par repiquage chez la souris Swiss
- des souris Nude non sacrifiées permettront de surveiller l'apparition de lésions.

La mesure de l'activité sera basée sur (a) l'arrêt de la multiplication, (b) la bactéricidie par dénombrement des bacilles survivants, seule façon de montrer si la prophylaxie peut éviter la progression vers la maladie et (c) la prévention de l'apparition des lésions chez les Nude.

Sur la base de 5 animaux par point de mesure (10 pour la surveillance des lésions chez les Nude), il faudra :

- pour les groupes traités et contrôle : 250 Nude et 230 Swiss
- pour les repiquages : nombre adéquat de souris Swiss selon les résultats de la bactériostase.



# Annexe 1 : Missions et organisation du CNR-MyRMA

## 1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR-MyRMA

### 1.1.1. Cahier des charges de l'appel d'offre pour la période 2012 – 2016

Le Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux et ses éventuels laboratoires associés s'engagent à assurer les missions définies par l'arrêté du 29 novembre 2004 fixant les modalités de désignation et les missions des CNR.

Il sera particulièrement demandé au Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux de :

#### 1. Apporter son expertise microbiologique :

- développer et évaluer les nouvelles techniques de diagnostic de la maladie et de l'infection tuberculeuse ainsi que le diagnostic des infections à mycobactéries atypiques et à mycobactéries dites rares,
- identifier les souches de mycobactéries du complexe tuberculosis et les autres espèces de mycobactéries adressées par les laboratoires,
- étudier la sensibilité des souches mono, multi et ultra résistantes, y compris vis-à-vis des anti-infectieux non utilisés usuellement, en développant les techniques adaptées, notamment les méthodes moléculaires de diagnostic rapide,
- contribuer à l'étude des mécanismes de résistance aux antituberculeux en collaboration avec le Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques,
- participer au contrôle de qualité des tests de sensibilité aux antituberculeux pratiqués par les laboratoires de biologie médicale,
- assurer un appui au diagnostic aux biologistes confrontés à des souches résistantes et un appui thérapeutique aux cliniciens et aux centres de lutte antituberculeuse pour l'établissement de protocoles de traitement/prophylaxie adaptés aux souches en cause.

#### 2. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'institut de veille sanitaire :

- contribuer à la surveillance de la méningite tuberculeuse, des mycobactérioses et de la lèpre,
- contribuer à l'investigation des cas groupés ou d'épidémies en réalisant l'identification, le typage moléculaire et l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux des souches de mycobactéries,
- contribuer à la surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antituberculeux et de la résistance multiple de *M. tuberculosis*, en s'appuyant sur les réseaux existants et en veillant à leur représentativité,
- participer aux systèmes de surveillance européens et internationaux.

#### 3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'institut de veille sanitaire tout événement inhabituel : augmentation inhabituelle de cas ou modification de leurs caractéristiques ; apparition de cas groupés ; modification des formes



cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), modification des profils de résistance ; apparition de souches inhabituelles ; etc.

### **1.1.2. Position du problème, orientations prioritaires**

Les mycobactéries constituent une famille d'une centaine d'espèces responsables :

- de deux grandes maladies **contagieuses** : la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis* complex) et la lèpre (*Mycobacterium leprae*).
- d'infections opportunistes **non contagieuses** acquises à partir de l'environnement, en particulier chez les sujets immunodéprimés ou en situation iatrogène : les mycobactérioses ou infections à mycobactéries dites « atypiques ».

#### **Tuberculose**

Malgré une régression très importante durant les dernières décennies, la tuberculose reste une infection fréquente dans les pays industrialisés. En France, **en 2012** l'incidence annuelle était **de 7,6 cas pour 100.000 habitants**, (mais 24 en Ile-de-France et à Paris, données InVS) **et ~ 5000 cas ont été déclarés** à travers le système de notification obligatoire (source InVS).

La tuberculose frappe essentiellement deux groupes de population en France : (a) les sujets âgés nés en France (surtout dans la tranche d'âge  $\geq 60$  ans) et (b) les sujets jeunes nés à l'étranger (surtout dans la tranche d'âge 20-44 ans). L'incidence de la tuberculose est beaucoup plus élevée (20 à 400 pour 100 000 habitants) dans les pays non industrialisés.

**La résistance acquise aux antibiotiques antituberculeux** joue un rôle essentiel dans la prise en charge de la tuberculose. Les mécanismes moléculaires de la résistance acquise chez *M.tuberculosis* complex sont toujours des mutations dans les gènes chromosomiques (pas de plasmide ni de transposon de résistance).

La résistance acquise limite les possibilités thérapeutiques, surtout en cas d'accumulation de résistance à l'isoniazide et à la rifampicine (« **multirésistance ou MDR** ») et encore plus en cas de résistance supplémentaire aux fluoroquinolones et aux antituberculeux injectables autres que la streptomycine (amikacine, kanamycine, capréomycine) (« **ultrarésistance ou XDR** »). Dans ces cas, le succès thérapeutique est très compromis et les taux de mortalité sont élevés.

La fréquence de la tuberculose, sa gravité, son caractère contagieux, et le fait qu'il existe une vaccination capable de réduire l'incidence de la maladie (le BCG), en particulier des formes graves de l'enfant (méningite, miliaire), **justifie le système de signalement immédiat et de déclaration obligatoire (« DO ») géré par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS).**

Le fait que les formes multibacillaires (c.a.d. les formes à examen microscopique positif) soient de loin les plus contagieuses, et que les formes à culture positive permettent d'identifier avec précision l'espèce mycobactérienne impliquée (*M.tuberculosis*, *M.bovis*...) et de procéder à des tests de sensibilité aux antituberculeux, phénotypiques et génotypiques, **justifie une surveillance bactériologique à partir des laboratoires.** L'organisation de réseaux de laboratoires qui ont une activité de mycobactériologie (cf. plus loin) constitue une solution efficace pour la surveillance bactériologique.

#### **Lèpre**

La prévalence mondiale de la lèpre était en 2009 de 210 000 cas dans le monde. S'il n'y a pas de cas autochtones en France métropolitaine depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, le nombre de nouveaux cas de lèpre détectés dans l'ensemble des territoires ultramarins français était d'une centaine en 2008, dont la moitié à Mayotte pour un territoire de 190 000 habitants. Les 2 autres territoires qui restent les plus touchés par la lèpre sont la Guyane et la Nouvelle Calédonie (~20 cas par an). Bien que *M.leprae* ne soit pas cultivable in vitro, des techniques moléculaires permettent de l'identifier dans les prélèvements pathologiques et de déceler les mutations responsables de résistance acquise aux antiléproux (dapsonne, rifampicine, fluoroquinolones).

#### **Infections à mycobactéries atypiques**

Les infections à mycobactéries atypiques sont importantes en raison de leur implication chez les immunodéprimés (ex. *M.avium* et SIDA), dans les infections iatrogènes (ex. *M.chelonae*, *M.xenopi*, *M.fortuitum*) et



chez des sujets atteints d'affections respiratoires chroniques telles que la mucoviscidose (ex. *M.kansasii*, *M.fortuitum*, *M.xenopi*, *M.abscessus*).

Ces infections, dont le nombre est estimé à environ 500 cas par an en France posent de difficiles problèmes thérapeutiques en raison du tout petit nombre d'antibiotiques naturellement actifs et de la facilité avec laquelle on sélectionne in vivo sous traitement des mutants résistants aux rares antibiotiques actifs (exemple : clarithromycine et *M.avium*).

### **Organisation de la mycobactériologie en France, conséquences sur la surveillance microbiologique**

En raison du regroupement des laboratoires pour faire face aux exigences réglementaires (accréditation...) et de laboratoires qui confient tout ou partie du travail à des laboratoires « sous-traitants », le nombre de laboratoires qui ont des activités de mycobactériologie a diminué (environ 200 en France en 2012). Il y a donc une demande croissante d'expertise extérieure en matière d'identification et de tests de sensibilité aux antibiotiques.

Dans les CHU où l'activité de mycobactériologie est développée en raison de grands volumes de demandes et de la présence de bactériologistes spécialisés, des équipes compétentes sont en place. Le regroupement de ces équipes au sein du **réseau universitaire Azay-mycobactéries** permet un travail en réseau basé sur des méthodologies solides. Pour les autres laboratoires (centres hospitaliers Généraux, laboratoires privés...) moins experts en mycobactériologie, le travail en réseau (**réseau CNR-MyRMA**) a l'avantage de permettre un recueil exhaustif d'informations mais doit être basé sur des méthodologies adaptées au temps limité que ces laboratoires peuvent y consacrer.

### **Développements des techniques de mycobactériologie**

Les **tests d'amplification génique** (TAG), très utiles pour la confirmation des cas de tuberculose à examen microscopique positif, ne sont pas encore satisfaisants pour le diagnostic de la tuberculose à examen microscopique négatif, en raison (a) d'un manque de sensibilité (faux négatifs) et (b) d'une proportion de faux positifs qui, bien que faible, aboutit à des valeurs prédictives positives trop basses quand les TAG sont appliqués à des patients chez lesquels la prévalence de la maladie est faible. De plus, les TAG ne sont pas fiables à ce jour pour le diagnostic des mycobactérioses. Il faudra donc (a) continuer à développer des tests plus performants et (b) mieux évaluer quelles sont les conditions d'application qui permettront d'obtenir des résultats utiles pour les prises de décision médicales (recherche bio-clinique).

Les tests génomiques destinés à **détecter les mutations conférant la résistance aux antituberculeux** ont fait l'objet de développements industriels récents. Les troupes proposées doivent être méticuleusement évaluées en terme de sensibilité et spécificité, mais aussi de valeurs prédictives en tenant compte de la prévalence de la résistance dans des situations épidémiologiques bien définies (nouveaux cas, rechutes, pays de naissance...). L'utilisation des tests génomiques étant délicate, il sera important de développer des **actions de formation**.

Les techniques de **génotypage** destinées (a) à étudier la phylogénie au sein des espèces mycobactériennes, en particulier *M.tuberculosis* et (b) à comparer les souches dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques (empreintes digitales génomiques) sont performantes et doivent être appliquées aux cas suspects d'être liés, ou systématiquement dans certaines circonstances (ex. cas MDR-XDR).

Enfin, les tests diagnostiques basés sur l'**approche immunologique** (ex. IGRA) sont en plein développement et il faudra poursuivre leur évaluation dans des conditions de terrain.

### **1.1.3. Place du Centre National de Référence**

En raison des **difficultés techniques inhérentes aux mycobactéries** et de la **dispersion des diagnostics des cas de tuberculose et de mycobactériose dans de nombreux laboratoires** malgré la diminution de leur nombre (cf supra) et de la diminution progressive du nombre de cas de tuberculose, il est particulièrement important :

- de **maintenir un centre d'expertise** pour (a) le diagnostic, (b) l'identification des souches difficiles, (c) les tests de sensibilité aux antibiotiques, en particulier aux antibiotiques de seconde ligne, (d) l'identification des gènes de résistance, (e) le génotypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques),
- d'évaluer les **nouvelles techniques** et développer **des contrôles de qualité**,
- d'offrir une aide au traitement pour les cas de tuberculose MDR et des infections à mycobactéries atypiques.



### Le CNR-MyRMA repose sur 2 laboratoires :

**Un laboratoire coordinateur**, (laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière à Paris, responsable Pr Vincent Jarlier) a la maîtrise des techniques mycobactériologiques classiques et génotypiques, une longue expérience des antituberculeux (tests de sensibilité, mécanismes de résistance, chimiothérapie expérimentale, conseil thérapeutique) et assure l'animation et la gestion de réseaux de laboratoires (réseau AZAY-mycobactéries et réseau CNR-MyRMA).

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

**L'association des 2 laboratoires augmente notablement les possibilités logistiques** et permet une suppléance pour les analyses d'expertise les plus courantes (mise en culture de prélèvements, identification de souches de mycobactérie, tests génotypiques et phénotypiques de résistance aux antituberculeux) qui peuvent être menées dans chacun des 2 laboratoires **ce qui assure la continuité du service** en cas de problème technique (ex. révision d'un des 2 laboratoires de confinement L3) et permet de **la mise en commun d'approches techniques complémentaires**.

#### **1.1.4. Tâches et missions spécifiques du laboratoire coordonnateur et du laboratoire associé**

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

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

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

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

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

#### **1.1.5. Principaux partenaires**

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

##### ***Le réseau Azay-Mycobactéries***

La surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux est basée sur la collaboration volontaire de laboratoires hospitalo-universitaires de Bactériologie, particulièrement impliqués en



mycobactériologie et organisés en réseau (Groupe " Azay Mycobactéries ", animé jusqu'en 2010 par Jeanne Texier-Maugein – Bordeaux et depuis 2011 par Christian Martin - Limoges). Pour ses activités de surveillance de la résistance, le réseau est conjointement animé par le CNR-MyRMA.

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

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

Le nombre de CHU participant au réseau Azay-Mycobactéries a doublé depuis 1995 : 15 en 1995, 23 en 2001, 27 en 2002, 33 en 2004, 35 en 2008 et 39 en 2013. Le réseau couvre maintenant toutes les régions métropolitaines françaises sauf la Corse qui n'a pas de CHU. Le nombre total de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les laboratoires du réseau est de **l'ordre de 1500** par an, soit **près d'un tiers du total des cas de tuberculose à culture positive identifiés en France**.

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

### **Le réseau CNR-MyRMA**

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

Ce réseau est aussi mis à contribution pour surveiller de manière intermittente certaines formes particulières de tuberculose (méningites, *M. bovis*...).

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

### **Autres collaborations**

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

## **1.2 Equipes**

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

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



- 1 Secrétaire (temps partiel, financement AP-HP)
- 1 Technicien de recherche en chimiothérapie expérimentale (financement fonds associatifs)
- 1 Technicien de recherche en biologie moléculaire (financement Université Paris 6)
- 1 Animalier (financement fonds associatifs)

### Laboratoire associé (Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière)

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

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

**Liste nominative des personnels participants aux activités du laboratoire coordonnateur (Pitié) et du laboratoire associés (Lariboisière) :** fonction, temps dédié au CNR-MyRMA en 2013 (en ETP), qualification, statut, site et organisme payeur

Nom	Prénom	Fonction	ETP	Qualification	Statut	Site	Organisme payeur
Jarlier	Vincent	Directeur	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Cambau	Emmanuelle	Responsable lab associé	0,25	Médecin biol.	PU-PH	Lariboisière	AP-HP
Veziris	Nicolas	Microbiologiste et pneumologue	0,5	Médecin	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Bernard	Christine	Microbiologiste	1	Pharm. biol.	PH	Pitié	<b>INVS</b>
Raskine	Laurent	Microbiologiste	0,25	Médecin biol.	PH	Lariboisière	AP-HP
Aubry	Alexandra	Microbiologiste	0,1	Médecin biol.	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Brossier	Florence	Microbiologiste	0,25	Pharm. Biol.	PH	Pitié	AP-HP
Sougakoff	Wladimir	Microbiologiste	0,25	Scientifique	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Robert	Jérôme	Epidémiologiste	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Rigoreau	Martine	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	AP-HP
Wichlacz	Claudine	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	AP-HP
Millot	Gérald	Technicien	0,5	Technicien	Tech	Pitié	AP-HP
Rasaova	Niriana	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	<b>INVS</b>
Levittas	Marine	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Pitié	<b>INVS</b>
Charlier	Véronique	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Brisilliat	Christine	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Moiline	Myriam	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Lariboisière	<b>InVS</b>
Catalano	Francesca	Secrétaire	0,25	Secrétaire		Pitié	AP-HP



## 1.3. Locaux et équipement

### Locaux

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

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

Les activités se déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité L3 (150 m<sup>2</sup>) consacré à la mycobactériologie (et aux alertes Biotox).
- dans les pièces adjacentes consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie fluorescente) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage...).

La gestion informatique des réseaux partenaires, ainsi que l'animalerie de chimiothérapie expérimentale, sont localisées dans la partie universitaire du laboratoire, au 5<sup>e</sup> étage de la Faculté de Médecine, située sur le même campus.

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

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

Les activités du CNR se déroulent :

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

### Principaux équipements

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

##### **Laboratoire de sécurité L3**

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

##### **Biologie moléculaire**

- extracteur d'acide nucléique de sécurité (pression négative) Roche MagNA Pure,
- extracteur d'acide nucléique automatisé QIAcube (QUIAGEN),
- 2 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Biorad iCycler, Biorad DNAEngine),
- 2 amplificateurs automatisés pour PCR « en temps réel » (MJResearch PTC-200, ABI7000),





- matériel d'hybridation manuel TwinCubator pour les bandelettes Hain,
- automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain,
- séquenceurs ADN : un monocapillaire ABI 310 (dans le laboratoire) ; un 16 capillaires ABI (sur plateforme de site dédiée aux analyses de biologie moléculaire),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé Biorad CEF-DR2,
- logiciel Gel Compar pour l'analyse des profils de génotypage,
- 1 imageur Biorad Chemidoc-XRS pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV et des membranes d'hybridation en chimioluminescence,
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques Pharmacia Gene Quant II,
- matériel d'hybridation/lecture Accuprobe (BioMérieux).

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

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

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

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

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

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

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

##### **Biologie Moléculaire**

- 2 extracteurs automatiques d'acide nucléique (EZ1 QIAGEN et Arrow NORDIAG),
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques (Heliosy Thermo),



- 1 spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000,
- 5 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR,
- 1 amplificateur automatisé pour PCR « en temps réel » (Cepheid 4 modules),
- 2 amplificateurs pour PCR « en temps réel » (Rotor Gene et Smart Cycler),
- 1 automate d'hybridation GT-Blot 20 pour les bandelettes Hain Biocentric,
- 1 système d'hybridation manuelle TwinCubator,
- 2 séquenceurs 16 capillaires Applied Biosystem d'accès facile (commun à plusieurs laboratoires),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- 1 équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé (Pharmacia LKB Gene Navigator),
- 1 imageur (GelDoc XR Biorad) pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV,
- 1 automate pour électrophorèse capillaire d'ADN (Agilent) commun à plusieurs laboratoires pour test de génotypage Diversilab®.

#### **Autres équipements**

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

## **1.4. Démarche qualité**

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

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

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

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

**Procédure annexe** : Prélèvements.

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

### **Accréditation**

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



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

Le CNR-MyRMA a participé à plusieurs contrôles de qualité supranationaux en 2013 :

1. Contrôle de différentes étapes du diagnostic de la tuberculose (examen microscopique, culture, tests de sensibilité, amplification génique et détection moléculaire de la résistance) organisés dans le cadre du réseau européen de l'ECDC ERLNET-TB. Les résultats obtenus étaient conformes.
2. Contrôle de qualité européen de génotypage MIRU-VNTR en tant que membre du Global Network for the Molecular Surveillance of Multidrug Resistant Tuberculosis organisé par D. van Soolingen (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas). Pour chaque contrôle, trente extraits d'ADN de *M.tuberculosis* envoyés par le RIVM sont analysés en MIRU-VNTR 24. Les résultats du contrôle qualité réalisé en 2013 par le CNR-MyRMA sont excellents (100% des patterns correctement identifiés).

## Contrôles de qualité externe organisés par le CNR-MyRMA pour les laboratoires du réseau « AZAY-mycobactéries »

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

**Le contrôle de qualité 2014 est en cours d'organisation.**

## Traçabilité

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## Annexe 2 : Capacités techniques du CNR-MyRMA

### 2.1. Techniques de référence disponibles

#### Techniques phénotypiques

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

- Microscopie,
- Cultures en milieux solides et liquides,
- Amplification génique sur prélèvement (pour tuberculose)

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

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

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

##### Techniques de routine

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

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

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



## Techniques génotypiques

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

### a. Identification bactérienne

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

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

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène	Antibiotiques
Complexe <i>tuberculosis</i>	CepheidXpert RIF MTBDR <i>plus</i> <sup>a</sup> MTBDR <i>sl</i> <sup>b</sup>	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>pncA</i> <i>ethA</i> <i>ethR</i> <i>rrs</i>  <i>rpsL</i> <i>embB</i> <i>rrl</i> <i>atpE</i> <i>erm41 et rrl</i> <i>rrl</i>	rifampicine rifampicine, isoniazide, éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, éthambutol, fluoroquinolones isoniazide isoniazide, éthionamide pyrazinamide éthionamide éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, streptomycine streptomycine éthambutol linezolid bédaquiline macrolides macrolides rifampicine, fluoroquinolones, dapsonsone
<i>M. abscessus</i>			
Mycobactéries atypiques			
<i>M. leprae</i>	GenoType® LepraeDR		



Toutes mycobactéries

*rpoB*

rifampicine

*gyrA*

fluoroquinolones

*gyrB*

fluoroquinolones

### c. Génotypage

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

## 2.2. Marqueurs épidémiologiques disponibles

Les marqueurs épidémiologiques disponibles, c'est-à-dire même de caractériser des souches, sont :

- les **marqueurs de résistance** (mutations chromosomiques) dont la liste est dressée dans le Tableau ci-dessus,
- les marqueurs utilisés pour le génotypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques) également listés dans le Tableau ci-dessus, en particulier la technique MIRU-VNTR 12-24 loci.

## 2.3. Collections de souches de référence

### Description des souches

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

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.

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

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

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

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



### Condition de stockage

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

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

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

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

### Conditions de mise à disposition des collections

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

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

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

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

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

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



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

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