



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 2014

Avril 2015

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.....	9
1.1. Nouvelles techniques introduites en 2014	9
2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE POUR LES LABORATOIRES FRANÇAIS EN 2014	12
2.1. Nombre de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA en 2014	12
2.2. Identification des souches reçues	12
2.3. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques	16
2.4. Détection de mutations impliquées dans la résistance acquise aux antibiotiques	24
3. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE	35
3.1. Surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux	35
3.2. Surveillance de la lèpre en France	47
3.3. Etude génotypique des souches de <i>M.tuberculosis</i> : détection et investigation des cas groupés	48
4. ALERTES	56
4.1. Tuberculose MDR	56
4.2. Mycobactérioses	57
5. ACTIVITÉS D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	58
5.1. Information	58
5.2. Formation	58
5.3. Activités de conseil	59
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATION EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR- MYRMA	63
6.1. Travaux de recherche 2014 ou en cours	63
6.2. Publications et communications	72
7. COOPÉRATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTÉ ANIMALE, D'HYGIÈNES ALIMENTAIRES ET ENVIRONNEMENTALES	78
7.1. Santé animale	78
7.2. Environnement	78
7.3. Alimentation.....	79
8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ 2014 - 2015.....	80
8.1. Développement et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic	80
8.2. Activités de Surveillance	81
8.3. Activités d'information, formation, conseils	82
8.4. Travaux de recherche en lien avec l'activité du CNR	82
ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR-MYRMA	85
1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR-MyRMA	85
1.2. Equipes	89
1.3. Locaux et équipement.....	91
1.4. Démarche qualité	93

ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR-MYRMA.....95

2.1. Techniques de référence disponibles 95

2.2. Marqueurs épidémiologiques disponibles 97

2.3. Collections de souches de référence 97

2.4. Liste des techniques recommandées par le CNR MyRMA..... 98



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

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

Responsable administratif : Mr Serge MOREL, Directeur du groupe hospitalier, assisté de Mme Béatrice LE BALANGER, 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

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



Résumé analytique des résultats 2014 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,

Un laboratoire associé : laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière à Paris, responsable Pr Emmanuelle Cambau

Ces 2 laboratoires maîtrisent toutes les techniques phénotypiques et génotypiques de base en mycobactériologie et sont équipés de secteurs de sécurité L3, ce qui permet (a) **la suppléance pour les analyses d'expertise courantes et la continuité du service** en cas de problème technique (ex. révision d'un des 2 secteurs L3) et (b) la **mise en commun de compétences et d'approches techniques complémentaires** :

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

(ii) mycobactérioses iatrogènes et liées aux soins, infections cutanées (*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 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 d'une quarantaine de laboratoires hospitalo-universitaires couvrant toutes les régions métropolitaines 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 2014) 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 (cf. aussi Annexes)

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. A titre d'exemple, le **séquençage génome entier** (« haut débit »), les technique de **REP-PCR** semi-automatisée (DiversiLab®) pour l'identification et la détection de clonalité (génotypage) et la technique **MALDI-ToF** ont été introduites au CNR en 2013-2014 (cf § 2.1.).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Le CNR-MyRMA a participé en 2014 à des contrôles de qualité externe en ce qui concerne le diagnostic bactériologique de la tuberculose et des infections à mycobactéries atypiques. Une série de prélèvements et de souches ont été reçues dans le cadre du réseau européen de l'ECDC ERLNET-TB pour examen microscopique, culture, identification, tests de sensibilité, amplification génique, détection moléculaire de la résistance) organisés par la société Instand (Dusseldorf, Allemagne). Les résultats étaient conformes.

Le CNR-MyRMA a participé en 2014, en tant que membre du « Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis », au contrôle de qualité de génotypage MIRU-VNTR organisé par le RIVM (Bilthoven, Pays-Bas). Les résultats étaient conformes.

Les 2 laboratoires du CNR-MyRMA se sont inscrits dans la démarche d'accréditation par l'intermédiaire des hôpitaux dans lesquels ils sont insérés. Leurs membres participent aux groupes de travail mis en place pour l'accréditation de l'ensemble des laboratoires des 2 hôpitaux : gestion des non-conformités, contractualisation prescripteurs/laboratoires, infrastructures et locaux.

Les portées initiales enclenchées en 2014 et qui feront l'objet d'une inspection COFRAC fin 2015 ou début 2016 comprennent plusieurs techniques (coloration, identification génomique, tests IGRA, hémocultures ainsi que l'ensemble des étapes pré- et post- analytiques qui sont communes à toutes les techniques.

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

En 2014 le CNR-MyRMA a reçu **1467 souches et prélèvements**.

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

- 29% d'augmentation du nombre de souches soumises à identification (n=871) et à génotypage (n=227)
- 38% d'augmentation du nombre de souches soumises à un antibiogramme de 1^{ère} ligne (n = 236)
- 89% d'augmentation du nombre de souches soumises à un antibiogramme de 2^{ème} ligne (n=2012, + 17% par rapport à 2013), qui demande beaucoup de travail par l'utilisation de nombreux milieux de culture spécifiques non commercialisés.

En 2014, un total de 1710 tests génomiques pour recherche de mutations impliquées dans la résistance (*M. tuberculosis* 1452, mycobactéries atypiques 165, *M. leprae* 93) ont été effectués pour 468 souches (*M. tuberculosis* 284, mycobactéries atypiques 153, *M. leprae* 31)

Les principaux résultats ont été les suivants :

- parmi les souches du complexe *M. tuberculosis* identifiées jusqu'au niveau de l'espèce, **81% étaient *M. tuberculosis***, espèce principale responsable de tuberculose humaine, 6% *M. bovis* et 4% *M. africanum*, chiffres stables depuis plusieurs années. Pour ces 2 dernières espèces, la proportion est biaisée car l'identification jusqu'au niveau de l'espèce est essentiellement faite au CNR pour les souches non typiques de l'espèce *M. tuberculosis* : souches lisses, dysgoniques...). Cf .§ 6 ci après pour une l'évaluation du nombre de cas à *M. bovis*.
- parmi les souches de mycobactéries dites atypiques, la distribution était : **45% complexe *M. avium-intracellulare***, 11% *M. xenopi*, 4% *M. kansasii*, 27% espèces dites « à croissance rapide », (*M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*), 9 % espèces rares ou nouvellement décrites.
- **90% souches de mycobactéries atypiques 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.
- 3 souches de mycobactéries atypiques isolées d'adénites chez des enfants de moins de 5 ans, en diminution par rapport aux années antérieures, **dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt de l'obligation vaccinale par le BCG en 2007**.
- **32% des souches de *M. tuberculosis* reçues étaient sensibles** à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine (multisensibles), **68% étaient résistantes à au moins un de ces 4 antibiotiques, la moitié étant multirésistantes (MDR)** c'est-à-dire résistantes à l'isoniazide et la rifampicine. Ces chiffres sont très différents de ceux générés par la surveillance nationale (cf résultats de la surveillance à travers les 2 réseaux du CNR-MyRMA, ci-après) et **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**. En revanche, l'analyse des souches reçues permet une étude précise des mécanismes de résistance.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- **Résistance aux antituberculeux de 2ème ligne parmi les souches MDR** : streptomycine 81%, éthambutol 70%, pyrazinamide 50%, éthionamide 84%, cyclosérine 19% et PAS 14%, au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 32%, fluoroquinolones 39%.
- La confrontation du nombre de souches MDR reçues pour expertise et des données issues de la surveillance spécifique à visée exhaustive à travers le réseau du CNR-MyRMA permet de déduire que le **CNR reçoit la quasi-totalité des souches MDR-XDR identifiées en France**.
- **augmentation du nombre de souches MDR** : ce nombre qui était resté stable entre 2006 et 2010 autour de ~ 51 par an, a augmenté en 2011 (n=69), 2012 (n=92) et 2014 (n=111), 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 (~10 /an en 2006 – 2010, 60 en 2014), principalement en Géorgie (1~ /an en 2006 – 2010, 40 en 2014) alors que les cas MDR de patients nés en France ou en Europe de l'ouest sont rares
- **augmentation du nombre de souches XDR** (MDR résistantes en plus aux fluoroquinolones et aux aminosides) : 1 ou 2 par an de 2006 à 2008, 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011, 17 en 2012, 22 en 2013 et 26 en 2014.
- **augmentation de la proportion de XDR parmi les MDR** : 2-3% en 2002 - 2005, 13% en 2010, 23% en 2014.
- la résistance **chez les mycobactéries atypiques n'est détectée que chez des patients déjà traités** (résistance 2aire par sélection de mutants résistants) : 10 % à la clarithromycine pour *M.avium-intracellulare* complex, 0% à la clarithromycine pour *M.xenopi*, 0% à la rifampicine pour *M.kansasii*.
- **principaux types de mutation conférant la résistance chez *M.tuberculosis*** : gène *rpoB* chez toutes les souches résistantes à la rifampicine (62% S531L) ; position 315 du gène *katG* (86% dont 67% S315T) (résistance de haut niveau) et/ou mutation dans la région régulatrice du gène *inhA* (28%) (résistance de à bas niveau si mutation isolée) pour l'isoniazide ; grande diversité des mutations dans le gène *pncA* pour le pyrazinamide ; positions 94 (57%) et 90 (25%) du gène *gyrA* pour les fluoroquinolones ; grande diversité de mutations dans le gène *ethA* pour l'éthionamide.
- **mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries atypiques** : 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.
- **aucun cas de résistance aux antibiotiques parmi les 31 cas de lèpre recensés.**

4. Surveillance de la résistance 1aire et 2aire à travers le réseau Azay-mycobactérie (CHU)

Les principaux résultats ont été les suivants :

- **caractéristique des 1547 cas de 2013 (recueil fait en 2014)** : 7,8 % antécédents de traitement, 5,8% VIH+, 64% nés à l'étranger.
- **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, ~ 50% en 2002, 63% en 2012. La plupart des pays d'Europe de l'Ouest constatent cette évolution (cf rapports OMS)
- **taux de résistance primaire** (pas d'antécédent de traitement) : 10% à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne, 5,6% à l'isoniazide, 2% à la rifampicine
- **le taux de résistance 1aire à l'isoniazide a significativement augmenté** (cf. rapport 2012) ce qui confirme l'importance de maintenir en France les recommandations de quadrithérapie (c.a.d. avec éthambutol) pour les nouveaux cas.
- le taux de multirésistance 1aire en 2013 (1,7%) est presque le double de celui de 2010 et 2009 (1%)
- **le taux de résistance 1aire diffère selon le pays de naissance** : 9% chez les patients nés en France mais 11,1% chez ceux nés à l'étranger ; surtout à la rifampicine : 1 % chez les patients nés en France mais 2,6% chez ceux nés à l'étranger
- **taux de résistance secondaire** (patients avec antécédents de traitement) : 38,1% à au moins un des 4 antituberculeux (3 fois celui vu pour les nouveaux cas), 32,2% à l'isoniazide (16,7 % en 1995), 28,8% à la rifampicine (7,9% en 1995)
- **l'augmentation importante des taux de résistance 2aire** est liée au quadruplement du nombre de cas de tuberculose MDR (7% en 1995, 26% 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 ont été diagnostiqués chez des patients nés à l'étranger ; le taux de résistance à chacun des 4 antituberculeux était bas chez les patients nés en France.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- la quasi-totalité (91%) des cas **résistants à la rifampicine** sont aussi résistants à l'isoniazide ce qui en fait un **bon marqueur de multirésistance**.

5. Surveillance à visée exhaustive de la tuberculose à bacilles multirésistants à travers le réseau CNR-MyRMA

Les principaux résultats ont été les suivants :

- **4235 cas de tuberculose à culture positive** recensés pour l'année **2013** (recueil en 2014) à travers les 260 laboratoires du réseau, dont **la moitié concentrés dans 20 laboratoires** (15 CHU, 2 CHG d'Ile-de-France, 2 gros laboratoires privés). Malgré cela, les cas MDR sont **répartis dans 36 laboratoires, 15% dans 118 laboratoires diagnostiquant moins de 20 cas de tuberculose par an**, ce qui justifie l'effort d'intégrer dans le réseau tous les laboratoires qui pratiquent la mycobactériologie.
- **82 cas MDR**, soit **1,9 % (IC : 1,6%-2,4%)** du total des cas de tuberculose.
- ce % de cas MDR calculé sur l'ensemble des 4235 cas diagnostiqués par les laboratoires qui pratiquent la mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) est inférieur à celui calculé sur les 1547 cas diagnostiqués par les laboratoires de CHU du réseau Azay-Mycobactéries (4%), 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**.
- **le % de cas MDR a augmenté depuis le début de la surveillance en 1992** : 0,4-0,7% en 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 2013), Bretagne et Poitou-Charentes (0-3 cas/an en 2006-2011 ; 7 en 2013), Ile-de-France (~30 cas/an avant 2011 ; 35 en 2013). **L'Ile-de-France cumule la moitié du total des cas MDR.**
- **caractéristiques des cas MDR** : 81% d'hommes, 92% nés à l'étranger (dont 57% en Europe de l'Est dont 42% en Géorgie, 19% en Afrique sub-saharienne, 3% au Maghreb, 10% en Asie), âge médian 34 ans, 9% VIH+, 91% forme pulmonaire, 47% sans antécédents de traitement (MDR « 1aire »).
- **les caractéristiques des cas MDR se sont beaucoup modifiées** durant les 19 années de la surveillance : **antécédents de traitement** (73% à 47%), **patients nés à l'étranger** (53% à 91%), essentiellement en Europe de l'est et ex-URSS.

6. Surveillance de formes particulières de tuberculose

- **tuberculose à *M. bovis*** (réseau AZAY-Mycobactéries des CHU) : les cas à *M. bovis* représentaient 0,9% de 1119 cas de tuberculose humaine diagnostiqués en 2013 à travers le réseau AZAY des CHU et pour lesquels l'espèce est identifiée en routine, ce qui permet d'extrapoler à une cinquantaine le nombre de cas *M. bovis* en France.
- 3 cas de **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** (0 à 2 cas/an avant 2011).

7. 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.

8. Surveillance de la lèpre en France

31 cas de lèpre ont été bactériologiquement confirmés en 2013 : 14 à Mayotte, 1 à la Réunion, 2 à Tahiti et 14 en métropole chez des migrants de régions où la lèpre est encore présente.

9. Etude génotypique des souches de *M. tuberculosis* pour l'investigation de cas groupés

- le génotypage a permis de **confirmer la relation entre les cas dans 18 des 28 situations** soumises à enquête (**total 39 cas**) qui comportaient chacune de **2 à 13 cas reliés** : 2 fois au sein de familles (2 cas ; 3 cas) ; 2 fois au sein d'une école (2 cas ; 1 cas lié à 12 cas de 2012-13 soit 13 cas sur 2 ans) ; 2 fois au sein de foyers (2 cas ; 5 cas) ; 11 fois dans un contexte amical ou de travail (7 fois 2 cas ; 3 fois 3 cas ; 1 fois 4 cas) ; 1 fois en milieu de soins (2 cas).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- les clades (lignées, phylums) en cause étaient « nt » (n=8), Beijing (n=3) et LAM (n=2).
- le nombre d'enquêtes autour d'un cas pour lesquelles le CNR-MyRMA a génotypé des souches a augmenté de 50% entre 2006-2011 (~20/an) à 2012-2014 (~30/an). Le nombre de souches génotypées a augmenté de 40% de 2013 à 2014.

10. Etude génotypique systématique des souches MDR et XDR

- la proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing est passée de 19 à 47 % entre 2006 et 2014, en relation avec l'augmentation de la part des cas MDR chez des patients nés en ex-URSS.
- les résultats révèlent l'existence de **15 clusters de souches pour un total de 64 des 110 souches étudiées (58%) partageant des codes MIRU 24 identiques** : 5 de lignée Beijing, 4 de lignée LAM, 1 de lignée URAL, 1 de lignée EAI, 4 de « nt ». 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 15 clusters** a permis de confirmer un lien bactériologique et épidémiologique pour 11 groupes de 2 cas : 4 de lignée Beijing (2 familles ; 2 acquisitions sur un campus hospitalier) ; 4 de lignée nt (famille, milieu désocialisé, 2 cas rattachés à une épidémie communautaire de 9 cas sur 7 ans en Corse) ; 1 de lignée LAM (famille) ; 1 de lignée URAL (famille) ; 1 de lignée EAI (famille).
- on est **passé de 1 ou 2 cas de transmission de souches MDR en France** pour la période 2006-2009 à **4** en 2010-2012, **7** en 2013 et **11** en 2014.

11. Alertes

Le CNR-MyRMA a été mis à contribution par les autorités de santé en tant qu'expert lors de 6 alertes de cas de tuberculose (2 alertes) ou d'infections à mycobactéries atypiques en situation iatrogène (4 alertes).

12. 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, (b) fiches des enquêtes annuelles, (c) résultats annuels de la surveillance résistance, (d) publications du CNR-MyRMA, (e) rapports d'activité du CNR-MyRMA, (f) diapositives des formations organisées par le CNR-MyRMA.
- accueil de 11 stagiaires pour une durée totale de 34 mois, **soit une moyenne de 3 stagiaires présents tout au long de l'année**.

13. Conseils thérapeutiques pour la prise en charge des infections à mycobactéries

- **113 patients MDR ou XDR** ont fait l'objet de conseils thérapeutiques et de prise en charge des malades lors de 11 réunions du « **Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile** » (total 174 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) 2 praticiens du Centre Médical de Bligny, (c) 2 pédiatres (hôpital Trousseau), (d) 1 pneumologue (Pitié-Salpêtrière), (e) 1 membre du SAMU social de Paris, (f) 3 infectiologues (Pitié-Salpêtrière).
- l'activité du « Groupe thérapeutique », qui avait déjà augmenté de 50% de 2009 à 2011 (n=46 à 70 dossiers), puis doublé entre 2011 et 2012 (n=148), a encore augmenté de 12% depuis 2012 (n=174).

14. Conseils auprès des autorités sanitaires

- Mutuelle de Santé Agricole (MSA) sur la tuberculose bovine
- Haut conseil de la santé publique (HCSP) 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).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- ANSM au sujet de cas d'endocardites à mycobactéries atypiques.
- réseau de laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) créé sous l'égide de l'ECDC.
- comité formé par EUCAST (European Union Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing), EMA (European Agency for Medicine) et ESGMYC (ESCMID study group for mycobacterial infections) pour mettre en place un cahier des charges microbiologiques destiné aux industriels adapté aux nouveaux antituberculeux avant leur mise sur le marché (ex. délamanid et bédaquiline).
- comité qui réunit 4 sociétés savantes internationales (ATS, ERS, ESCMID, IDSA) chargé de proposer des recommandations pour le traitement des infections respiratoires à mycobactéries atypiques.
- comité de l'OMS pour le programme de lutte mondiale contre la lèpre.
- comité expert ERS/OMS pour les conseils de prise en charge des TB MDR en Europe.

15. Travaux de recherche 2014 ou en cours

Le CNR-MyRMA est adossé à l'équipe de recherche N°13, intégrée à l'UMRS CR7-INSERM 1135 « Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (CIMI) » de l'UPMC site Pitié-Salpêtrière.

Les travaux de recherche ont porté en 2014 sur :

a. Chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries :

- calcul des taux de mutations de résistance aux antituberculeux in vivo chez la souris
- activité stérilisante de traitements intermittents oraux dans l'infection à *M. ulcerans*.
- évaluation de l'activité des antiléprieux dans la prévention du passage de l'infection à la lèpre maladie (traitements « prophylactiques »)

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

c. Mécanismes de résistance chez les mycobactéries :

- chez *M. tuberculosis*, : (a) aux diarylquinolines (structure de l'ATP) ; (b) au pyrazinamide (activité de la pyrazinamidase) ; à l'éthambutol ; aux fluoroquinolones ; aux aminosides/peptide cyclique
- chez les mycobactéries atypiques à croissance lente, approches épidémiologique et moléculaire.

d. Impact d'une prophylaxie par azithromycine sur le risque d'infection à mycobactéries dans la mucoviscidose

e. Etude génotypique des mycobactéries par « séquençage génome entier » : (a) séquençage d'une souche de BCG-MDR ; (b) stratégie génomique pour étudier les souches MDR de la lignée Beijing (séquençage de 27 souches).

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

- 6 publications nationales
- 22 publications internationales
- 21 communications nationales
- 9 communications internationales
- 24 conférences sur invitation nationales
- 10 conférences sur invitation internationales

17. Santé animale et environnement

En 2014 nous avons organisé 2 réunions avec les vétérinaires sur l'infection tuberculeuse animale : avec l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (Maisons Alfort), en mars 2014 et à l'occasion des Journées de mycobactériologie de langue française du groupe MYCOMED de la Société Française de Microbiologie (Dijon, octobre 2014).

En 2014, nous avons étudié la diversité des espèces de mycobactéries présentes dans l'eau du réseau parisien au niveau des réservoirs de distribution ou des points distaux de puisage, par recherche concomitante de mycobactéries et d'amibes, ce qui a permis de montrer que les mycobactéries étaient très fréquemment présentes (~90% des prélèvements) dans les amibes en milieu naturel.

18. Programme 2015



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Développement et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic :

- méthode de typage moléculaire complémentaire pour les souches de lignée Beijing
- nouvelle trousse de détection moléculaire de la résistance aux macrolides et aux aminosides chez les mycobactéries atypiques
- mise en semi-routine de la méthode Epicenter®TBeXiST pour l'étude de la sensibilité de *M. tuberculosis* aux antituberculeux de 1ère et 2ème ligne
- quantification des mycobactéries dans les prélèvements par technique moléculaire
- mise en place en routine d'une nouvelle approche moléculaire pour la détermination de la résistance à l'éthambutol chez *M. tuberculosis*

Activités de surveillance de la tuberculose :

- surveillance de la résistance 1ère et 2ème via le réseau AZAY-mycobactéries et surveillance à visée exhaustive de la multirésistance via le réseau du 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 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 génotypique systématique des souches multirésistantes
- surveillance des méningites tuberculeuses à culture positive des enfants de moins de 5 ans (enquête annuelle).
- poursuite de la mise au point du registre national permettant d'e suivre la prise en charge des tuberculoses multirésistantes en France

Lèpre : analyse des prélèvements de patients résidant en France et suspects de lèpre et poursuite du programme d'appui au diagnostic bactériologique des cas de lèpre à Mayotte

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

- recherche de nouveaux mécanismes de résistance aux fluoroquinolones par séquençage complet du génome
- corrélation génotype/niveau de résistance aux fluoroquinolones
- étude de l'activité résiduelle in vivo des fluoroquinolones sur des souches mutées dans l'ADN gyrase
- étude structurale et fonctionnelle des ADN gyrase de *M. tuberculosis* et *M. leprae*
- étude structurale de l'ATP synthase de *M. tuberculosis*
- étude des mécanismes de résistance de *M. tuberculosis* au pyrazinamide
- méthodologie de calcul des taux de mutations de résistance aux antituberculeux in vivo
- étude des souches MDR de *M. tuberculosis* par séquençage du génome entier
- suite de la mise au point d'un modèle murin pour évaluer l'activité des antiléprieux dans la prévention du passage de l'infection à la lèpre maladie



1. Missions et organisation du CNR-MyRMA

Techniques disponibles

Pas de modification des missions depuis l'année précédente (cf. Annexe 1)

Pas de modification des de l'organisation depuis l'année précédente (cf. Annexe 1)

1.1. Nouvelles techniques introduites en 2014

n.b. la liste des techniques disponibles conservées depuis les années précédentes sont listées en Annexe 1

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

La PCR basée sur l'amplification de séquences répétitives (rep-PCR) est un procédé de typage moléculaire rapide qui utilise des amorces qui se lient à de multiples séquences non codantes répétitives intercalées dans le génome bactérien. Les profils d'amplification spécifiques générés par la rep-PCR permettent d'évaluer la similarité de différents isolats bactériens sur la base de la comparaison du nombre et de la taille des fragments amplifiés à partir de chaque souche. Cependant, la rep-PCR est connue pour être une technique très sensible aux conditions expérimentales, souffrant d'un manque de reproductibilité.

Le DiversiLab (DL) (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) est un système de rep-PCR semi-automatisé hautement standardisé.

En 2014, nous avons réalisé une évaluation de la rep-PCR DiversiLab en étudiant sa capacité à discriminer 52 souches de *M.tuberculosis* MDR pour lesquels les données épidémiologiques et moléculaires étaient disponibles et représentant les lignées actuellement prédominantes en France, et ceci comparativement à 3 autres techniques de typage moléculaire : le spoligotypage, l'analyse MIRU-VNTR 24 loci (la méthode la plus largement utilisée aujourd'hui pour le typage moléculaire des souches de *M.tuberculosis*) et l'analyse RFLP IS6110. Les résultats obtenus montrent que 50% des souches de *M.tuberculosis* analysées ne sont pas différenciables par le système DiversiLab, mais le sont par MIRU-VNTR et à l'analyse IS6110-RFLP.

En conclusion, les performances de la rep-PCR semi-automatisée apparaissent insuffisantes pour que la technique puisse être utilisée comme méthode de génotypage de *M.tuberculosis* en routine. Elle a toutefois l'avantage d'être standardisée et rapide. Elle peut être utile comme approche préliminaire d'analyse de la clonalité des souches au sein du complexe *M. tuberculosis* en cas d'épidémies ou pour l'investigation de cas liés à une source commune. L'obtention de profils DL différents permet d'exclure un lien récent de clonalité entre les souches étudiées. En revanche, lorsqu'un lien clonal est suggéré par DL (profils DL identiques), une confirmation par analyse MIRU-VNTR et/ou RFLP doit être apportée.

Ces résultats **ont été publiés en 2014** (Brossier, J Clin Microbiol).

La même technique, qui avait été évaluée en 2013 pour **l'identification et le génotypage au sein du complexe *M. abscessus*** (résultats publiés en 2014 : Mougari et al, J Clin Microbiol) a été mis en service en routine en 2014.



1.1.2. 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 définitifs ont été obtenus et publiés en 2014 (Fangous, J Clin Microbiol). Un 1er groupe de souches, identifiées sur la base du MLST, a servi à distinguer des pics de spectrométrie discriminants pour chacune des sous espèces. Un 2^{ème} groupe de souches a été étudié à l'aveugle pour leur profil de spectrométrie. Les résultats étaient concordants avec l'identification génétique pour 46/49 (%) des souches. Un algorithme a été proposé sur la base de l'étude de 5 pics (2081 Da, 3123, 3108, 3463 et 3378 Da) permettant l'identification des 3 sous espèces. Ces résultats, produits avec le **Maldi-Tof Brucker Daltona**, logiciel **MALDI Biotyper (3.0)** et la base Mycobacterium 2.0, ne peuvent cependant pas être appliqués directement aux autres bases et autres spectromètres.

1.1.3. Nouvelle méthode d'étude de la sensibilité de *M. tuberculosis* aux antituberculeux de 1ère et 2ème ligne

En 2014, nous avons achevé l'expertise 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 (E. Cambau), le CNR des mycobactéries de Suisse (Pr E. 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. **Les 2 dernières réunions de travail du comité de pilotage (E. Cambau, E. Bottger, M. Viveiros) consacrées à l'analyse des résultats se sont tenues en 2014.**

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 Tbxist. 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 souches résistantes ont été aussi soumises à une analyse génotypique : tests



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

commerciaux (type GenoType MDR plus et MDrrsl) et PCR-séquançage de 14 gènes connus pour être impliqués dans la résistance.

Les résultats des 9 centres ont été colligés par E. Cambau et publiés en 2014 dans J Antimicrob Chemother. La concordance entre la résistance phénotypique et génotypique était > 80% sauf pour l'éthambutol (70%). Le temps médian d'obtention des résultats de résistance était de 5 jours (extrêmes 3.5 – 13.5 jours).

La technique a permis de **distinguer haut niveau de résistance**, qui exclut une efficacité in vivo (49% des couples souches/antibiotiques), **bas niveau et niveau intermédiaire**, (16% et 35%, respectivement) ce qui est important sur un plan thérapeutique. En effet, dans des cas de résistance très étendues (souches XDR), ceci pourrait permettre de compléter un régime comprenant au moins deux antibiotiques actifs (c.a.d. auxquels la souche est pleinement sensible) avec des antibiotiques pour lequel il y a un bas niveau de résistance.

En conclusion, l'avantage de cette nouvelle méthode est de donner des résultats (a) relativement rapides par rapport à la méthode de proportion classique en milieu solide, (b) plus complets que la méthode actuelle en milieu liquide MGIT car permet de tester la majorité des antituberculeux de 2ème ligne, (c) permet de déterminer de façon précise la proportion de mutants résistants et (d) de distinguer entre bas et haut niveau de résistance.

1.1.4. Séquençage « génome entier » des mycobactéries

Comparaison des stratégies de séquençage « génome entier » pour *M.tuberculosis*

Afin d'identifier quelle est la meilleure stratégie de séquençage génomique pour les mycobactéries, dans une perspective de re-séquençage et non de séquençage *de novo*, nous avons procédé au séquençage en parallèle sur deux plateformes (GS Junior de Roche, laboratoire de bactériologie de l'hôpital Lariboisière et MiSeq Illumina (GATC Biotech, Constanz, Allemagne) des ADN de *M. tuberculosis* H37Rv et d'une souche MDR de *M. bovis* BCG.

Nous avons **sélectionné la technique MiSeq Illumina pour le séquençage des souches de *M. tuberculosis* MDR** (cf. § 6.1.5).

Séquençage « génome entier » des mycobactéries atypiques

Nous avons mis au point un protocole d'extraction, de qualification de l'ADN génomique, et de séquençage « génome entier » des mycobactéries atypiques sur une plateforme partenaire (cf paragraphe V.4.). Ce projet pilote a été mené sur une souche de *M. abscessus*. L'analyse bioinformatique des séquences a permis de montrer l'apport du séquençage « génome entier » dans les infections à *M. abscessus* pour (i) l'épidémiologie (par l'identification de Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) spécifiques permettant de différencier *M. abscessus* sensu stricto, *M. massiliense*, et *M. bolletii*), (ii) l'identification des souches (par la construction d'arbres phylogénétiques à partir de la séquence génomique) et (iii) la détection de la résistance à la clarithromycine (identification de SNP dans *rrl* et *erm*(41), qui sont associés à la résistance à la clarithromycine).



2. Activités d'expertise pour les laboratoires français en 2014

2.1. Nombre de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA en 2014

En 2014 le CNR-MyRMA a reçu **1467 souches et prélèvements** pour identification et/ou typage moléculaire et/ou étude de la sensibilité aux antibiotiques de *M.tuberculosis* ou mycobactéries atypiques, et biopsies pour diagnostic de lèpre et tests moléculaires de sensibilité aux antiléproux (**Tableau 1**). Les souches et prélèvements proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et DOM-TOM (laboratoires hospitaliers, LABM...).

Tendances évolutives 2007-2014

Le nombre total de souches et prélèvements reçus a augmenté (+ 20%) depuis 2007. Le **nombre de souches de *M.tuberculosis* reçu 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*. En effet, par rapport à la moyenne des années 2007 à 2011, on note :

- **29% d'augmentation** du nombre de souches soumises à identification
- **29% d'augmentation** du nombre de souches pour lesquelles un **génomotypage** a été fait (le chiffre de 2012, très élevé, était dû à un rattrapage des tests qui n'ont pas pu être faits en 2011).
- **38% d'augmentation** du nombre de souches soumises à un **antibiogramme de 1^{ère} ligne**
- **89% d'augmentation** du nombre de souches soumises à un **antibiogramme de 2^{ème} ligne** (+ 17% par rapport à 2013), test 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,

2.2. Identification des souches reçues

871 souches ont été soumises à identification de l'espèce mycobactérienne et, pour la plupart ont été aussi soumises à un antibiogramme phénotypique et/ou à des tests génotypiques de détection de résistance et/ou à un génotypage pour enquête épidémiologique : **501 souches du complexe *M. tuberculosis*** et **370 souches de mycobactéries atypiques**.

Souches de *M. tuberculosis* complex

Parmi les **501 souches de *M.tuberculosis* complex reçues en 2014**, 189 (38%) 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 189 souches, la distribution des espèces (peu représentative pour les raisons de biais ci-dessus) étaient (**Tableau 2**) :

- **153** de l'espèce *M. tuberculosis*, qui reste l'espèce principale responsable de tuberculose humaine,
- **16** de l'espèce *M. bovis* var *BCG* (nombre à peu près stable depuis 2007),
- **11** 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),
- **8** de l'espèce *M.africanum* (stable par rapport à 2007) et **1** de l'espèce *M.microti*



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Total souches et prélèvements	1233	1233	1159	1155	1426	1338	1421	1467
Souches soumises à identifications^a	825	944	873	794	988	897	900	871
<i>M. tuberculosis</i>	370	452	369	366	385	430	492	501
Mycob. atypiques	455	492	504	428	603	467	408	370
Souches soumises à tests phénotypiques de sensibilité	432	442	470	468	551	542	464	548
<i>M. tuberculosis</i> ^b	170 (73)	185 (90)	170 (135)	160 (126)	170 (139)	217 (164)	211 (181)	236 (212)
Mycob. atypiques	262	227	300	308	381	325	253	312
Souches soumises à génotypage^c	215	183	192	153	119	276	203	227
<i>M. tuberculosis</i>	203	172	175	153	119	267	198	225
Mycob. atypiques	12	11	17	-	-	9	5	2
Prélèvements (hors <i>M.leprae</i>)	151	115	112	140	169	163	238	187
Biopsies <i>M.leprae</i>^d	10 (2)	18 (7)	17 (7)	25 (7)	51 (22)	53 (24)	45 (25)	87 (31)

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^{re} ligne et un antibiogramme de 2^e ligne**

c : empreintes digitales génomiques (épidémiologie)

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

Tableau 2 : Identification des souches de mycobactéries du complexe *M.tuberculosis* reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2014

Espèces	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>M. tuberculosis</i> complex sans identification au sein du complexe	229	363	308	209	143	229	216	312
Identification au sein du complexe * :	141	89	61	157	242	201	277	189
<i>M. tuberculosis</i>	114	63	42	140	212	164	240	153
<i>M. bovis</i>	9	11	7	6	12	13	11	11
<i>M. africanum</i>	10	11	5	6	7	8	15	8
<i>M. bovis</i> var BCG	8	4	3	5	9	13	11	16
<i>M. caprae</i>			2					
<i>M. canettii</i>					1	3		
<i>M. microti</i>			2		1			1
Total <i>M. tuberculosis</i> complexe	370	452	369	366	385	430	493	501

*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 370 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2014, la répartition des principales espèces était la suivante (Tableau 3) :

- **169 souches (45% du total) du complexe *M. avium-intracellulare*** dont 93 *M. avium* et 71 *M. intracellulare* et 5 *M. chimerea*. Parmi ces souches, (n=103 soit 77%), ont été considérées comme responsables d'infections.
- **40 souches de *M. xenopi*** (11% du total). Toutes étaient d'origine respiratoire sauf 1 (isolée d'un genou chez un patient traité à plusieurs reprises pour des infections récurrentes à *M. xenopi*). Parmi ces souches, 34 (85%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **73 souches de *M. abscessus complex*** (61 souches de *M. abscessus subsp. abscessus*, 10 souches de *M. bolletii*, 2 souches de *M. massiliense*) dont :
 - 64 étaient issues de prélèvements respiratoires (dont 31 issues de patients atteints de mucoviscidose)
 - 9 de prélèvements cutanéomuqueux ou sur PAC (chez 5 patients)
- **17 souches de *M. chelonae***, dont 14 étaient responsables d'infections extra-respiratoires (le plus souvent cutanéomuqueuse, mais aussi 2 épisodes de septicémies) et 3 issues de prélèvements respiratoires (2 responsables d'infections pulmonaires).
- **12 souches de *M. fortuitum*** (9 patients) dont 4 responsables d'infections cutanéomuqueuses, 2 de septicémies, 5 d'infections pulmonaires (chez 3 patients). Une souche a été isolée à partir de l'eau.
- **9 souches de *M. kansasii*** (4% du total), agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose. Parmi ces souches, 8 ont été considérées comme responsables d'infections.
- **5 souches de *M. simiae*** ont été considérées comme responsables d'infection.
- **4 souches de *M. marinum***, agent classique d'infections cutanées après inoculation à partir d'aquariums ou d'animaux aquatiques, dont 1 souche issue d'une source potentielle d'un des cas (piscine). Il n'y a pas eu en 2014 de cas groupés faisant craindre une exposition commune.
- **9 souches de *M. gordonae*** qui correspondaient toutes à des contaminations.

Une partie des souches de mycobactéries atypiques reçues en 2014 (n=35 soit 9% du total) appartenaient à des espèces rares ou récemment décrites :

- 4 souches appartenaient au complexe *terrae* (dont 2 souches de *M. kumamotonense* espèce décrite en 2006 et 2 souches de *M. arupense*, espèce décrite en 2006) dont 1 considérée comme responsable d'infection (synovite).
- 6 souches de *M. lentiflavum* (mycobactérie proche de *M. simiae* et *M. genavense*, décrite en 1996), 5 considérées comme un contaminant et 1 comme responsable d'une infection respiratoire.
- 2 souches de *M. malmoeense*, dont 1 considérée comme responsable d'infection (abcès sous mandibulaire).
- 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.
- 1 souche de *M. shimoidei* (mycobactérie proche de *M. xenopi*) considérée comme responsable d'une infection respiratoire.
- 6 souches de *M. szulgai*, toutes responsables d'infections.
- 2 souches de *M. peregrinum* (1^{ère} description en 1962) dont 1 considérée comme responsable d'infection respiratoire.
- 3 souches de *M. conceptionense* (proche de *M. fortuitum*) isolées de liquides articulaires de 2 patients, l'une responsable d'infection, doute sur une contamination du prélèvement pour l'autre car les deux cas ont été diagnostiqués dans le même laboratoire. Un génotypage des souches est en cours pour résoudre le doute.
- 5 souches de *M. mucogenicum* (espèce proche de *M. chelonae*, décrite en 1995) dont une responsable d'infection cutanée chez une patiente atteinte de LAL, et les autres considérées comme des contaminants (issues de prélèvements respiratoires).
- 2 souches de *M. setense* (proche de *M. peregrinum* et *M. fortuitum*) dont une issue d'un endoscope duodénal et une considérée comme responsable d'infection respiratoire.
- 1 souche de *M. septicum* issue d'une biopsie cutanée.
- 1 souche de *M. goodii* (1^{ère} description en 1999) responsable d'une ostéite.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Au total, 334 des 373 (90%) souches de mycobactéries atypiques reçues en 2014 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 2006-2014

Le nombre de souches de mycobactéries atypiques reçues **et considérées comme responsables d'infection** a augmenté de 30% entre 2007 (n=262) et 2013-2014 (n=341 et 334 respectivement) en lien avec 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 2014 (Tableau 3).

Tableau 3 : Identification des souches de mycobactéries atypiques reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2014 (classement par ordre décroissant, basé sur les chiffres de l'année 2009)

Espèce	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>M. avium</i>	85 (19%)	71 (14%)	105 (21%)	96 (22%)	116 (19%)	100 (21%)	99 (24%)	93 (25%)
<i>M. intracellulare</i>	57 (13%)	77 (16%)	100 (20%)	82 (19%)	103 (17%)	105 (22%)	66 (16%)	71 (19%)
<i>M. chimerea</i>							17 (4%)	5 (1%)
<i>M. xenopi</i>	69 (15%)	66 (13%)	48 (10%)	52 (12%)	54 (9%)	49 (10%)	48 (12%)	40 (11%)
<i>M. gordonae</i>	35 (8%)	21 (4%)	33 (7%)	20 (5%)	23 (4%)	16 (3%)	15 (4%)	9 (2%)
<i>M. chelonae</i>	37 (8%)	41 (8%)	31 (6%)	31 (7%)	44 (7%)	40 (9%)	11 (3%)	17 (4%)
<i>M. kansasii</i>	28 (6%)	21 (4%)	31 (6%)	24 (6%)	26 (4%)	17 (3%)	18 (4%)	9 (2%)
<i>M. abscessus</i>	37 (8%)	44 (9%)	24 (5%)	35 (8%)	54 (9%)	44 (9%)	40 (10%)	61 (16%)
<i>M. bolletii</i>	3	5 (1%)	2	10 (2%)	10 (2%)	7	7 (2%)	10 (3%)
<i>M. massiliense</i>	6 (1%)	13 (3%)	15 (3%)	9 (2%)	18 (3%)	12 (3%)	9 (2%)	2 (1%)
<i>M. simiae</i>	6 (1%)	9 (2%)	19 (4%)	7 (2%)	11 (2%)	7 (1%)	6 (1%)	5 (2%)
<i>M. fortuitum</i>	15 (3%)	18 (4%)	18 (4%)	11 (3%)	25 (4%)	21 (4%)	14 (3%)	12 (3%)
<i>M. peregrinum</i>	20 (4%)	32 (7%)	16 (3%)	6 (1%)	12 (2%)	9 (2%)	3 (1%)	2 (1%)
<i>M. interjectum</i>	4	1	6 (1%)	0	2		1	1
<i>M. mucogenicum</i>	2	6 (1%)	6 (1%)	8 (2%)	11 (2%)	2	2	5 (2%)
<i>M. scrofulaceum</i>	3	5 (1%)	5 (1%)	4 (1%)	2		2	1
<i>M. szulgai</i>	3	3	3	3	8 (1%)	6	4 (1%)	6 (2%)
<i>M. marinum</i>	6 (1%)	10 (2%)	2	2	3	4	8 (2%)	4 (1%)
<i>M. arupense</i>	4	6 (1%)	2	2	5 (1%)	2	2	1
<i>M. genavense</i>		1	2	3	2	2	1	0
<i>M. haemophilum</i>			1	0	0		1	0
<i>M. malmoense</i>	3	8 (2%)	1	2	6 (1%)	1	7	2 (1%)
<i>M. ulcerans</i>		1		1	0			0
Autres espèces	32 (8%)	34 (7%)	34 (7%)	20 (5%)	56 (9%)	23 (5%)	27 (7%)	14
Total	455	492	504	428	601	467	408	370
Infections** : N	262	227	300	308	381	325	341	334
%	58%	46%	59%	72%	62%	70%	84%	89%

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



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt en 2007 de l'obligation vaccinale par le BCG, 3 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2014 (*M. avium*) 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, baisse 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
2014	3*

* à noter aussi 2 cas chez des grandes enfants :

1 de 6 ans et 1 de 7 ans

2.3. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

2.3.1. Souches reçues pour tests de sensibilité

En 2014, 548 souches de mycobactéries ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques : 236 souches de *M.tuberculosis* complex (dont 212, soit 90%, ont fait l'objet d'un antibiogramme de 1^{ère} ligne et d'un antibiogramme de 2^{ème} ligne) et 312 souches de mycobactéries atypiques.

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

Les tests de sensibilité sur les **236 souches de *M.tuberculosis* complex** reçues pour cela ont été :

- un antibiogramme « **standard** » (antituberculeux de **1^{ère} ligne**) pour **24 souches**, pour vérification des résultats trouvés dans les laboratoires d'origine.
- un antibiogramme « **complet** », (antituberculeux de **1^{ère} ligne et de 2^{ème} ligne**) pour **212 souches, dont 111 envoyées pour multirésistance et 101 envoyées pour résistance à au moins l'isoniazide ou la rifampicine ou pour suspicion de multirésistance** (ex. 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^{ère} ligne des 236 souches testées en 2014 (Tableau 5)

- **25%** (n = 59) étaient sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine (**multisensibles**)
- **75%** (n = 177) étaient **résistantes** à au moins un de ces 4 antibiotiques dont **44%** (n=105) étaient **phénotypiquement multirésistantes** (MDR) c'est-à-dire résistantes à l'isoniazide et la rifampicine. Le nombre de souches MDR était en 2014 inférieur au total des souches reçues dans l'année (n=111) car 6 souches apparaissaient encore sensibles à la rifampicine in vitro malgré la présence de mutations dans le gène *rpoB* qui génèrent souvent à un bas niveau de résistance (4 L533P, 2 D516Y). Ces 6 souches ont néanmoins été considérées comme MDR.

Entre 2007 et 2014, la proportion de souches multisensibles parmi les souches reçues a diminué de 52 à 25%, 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...).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Inversement, la proportion de souches multirésistantes a augmenté de 22 à 44 % 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^{ère} 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 2014

		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014 ⁽¹⁾
Sensible*		88 (52%)	86 (47%)	54 (32%)	59 (37%)	51 (30%)	62 (29%)	67 (32%)	59 (25%)
Résistant	H	7 (4%)	12 (6%)	21 (12%)	13 (8%)	21 (12%)	20 (9%)	19	30
à au moins	S	6	9	6	7	6	7	4	4
1 antibiotique	R	1	6	5	4	5	9	9	11
mais non	E	-	-	1	0	0	1	0	0
multirésistant	H+S	27 (16%)	17 (9%)	24 (14%)	23 (14%)	22 (13%)	14 (6%)	28	22
	H+E	-	-	2	1	0	0	1	3
	H+S+E	3	3	5	7	1	1		2
	R+S						1		0
	R+E						1		0
	R+S+E	-	-	1	-		-	1	0
Sous-total		44 (26%)	47 (25%)	65 (38%)	56 (35%)	55 (33%)	54 (25%)	61 (29%)	72 (31%)
Multirésistant	H+R	12	10	8	5	7	22 (10%)	13	15
	H+R+S	8 (5%)	20 (22%)	21 (12%)	12	16	21 (10%)	16	12
	H+R+E	E		3	2	6	7	8	5
	H+R+S+E	16 (9%)	18 (10%)	19 (11%)	26 (16%)	35	51 (24%)	46	73
Sous-total		38 (22%)	52 (28%)	51 (30%)	45 (28%)	64 (37%)	101 (47%)	83 (39%)	105** (44%)
TOTAL GENERAL		170	185	170	160	170	217	211	236

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

** ce nombre de souches (105) est inférieur au total des souches MDR reçues dans l'année (111) car 6 souches apparaissent encore sensibles in vitro à la rifampicine malgré la présence de mutations dans le gène *rpoB* (4 L533P, 2 D516Y) qui génèrent souvent un bas niveau de résistance. Ces 6 souches ont néanmoins été considérées comme MDR.

Résistance aux antituberculeux de 2^{ème} ligne des 212 souches testées en 2014 (Tableaux 6-7)

- Résultats pour les 111 souches multirésistantes (MDR) :

Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient les suivantes (**Tableau 6**) : streptomycine 81%, éthambutol 70%, pyrazinamide 50%, éthionamide 64%, cyclosérine 19%, PAS 14%, au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 32%, fluoroquinolones 39%.

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 **23%** soit **26 cas de tuberculose XDR identifiées en 2014** (cf. ci-après, **Tableau 10**).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 6 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1^{re} et 2^e ligne des souches multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2007 à 2014

	Années (n souches testées)	2006 (53)	2007 (38)	2008 (51)	2009 (51)	2010 (45)	2011 (64)	2012 (92)	2013 (83)	2014 (111)
a	Ethambutol	58	45	37	47	66	70	58	66	70
	Pyrazinamide								40	50
	Streptomycine	75	76	76	78	75	80	70	73	81
b	Amikacine	6	5	10	8	13	9	13	20	12*
	Kanamycine	15	5	16	16	20	23	27	41	31*
	Capréomycine	9	8	10	10	12	11	14	23	18*
c	Fluoroquinolones	13	8	14	18	23	22	28	30	39 ^{\$}
d	Ethionamide	34	45	57	43	75	82	62	73	64
e	PAS	15	5	6	12	9	17	17	24	14
	Cyclosérine	10	11	37	20	9	18	28	24	19
	Bedaquiline									3
	Linezolid	0	0	0	0	0	0	1	0	1

a : antibiotiques de première ligne autres que isoniazide et rifampicine

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

c : entre dans la définition de XDR

d : ou prothionamide

e : antibiotiques bactériostatiques (de « dernière ligne »)

* au total : 71 souches sensibles aux 3 aminosides ; 13 résistantes aux 3 ; 17 monorésistantes à kanamycine ; 3 monorésistantes capréomycine, 3 résistantes à la kanamycine et la capréomycine

^{\$} parmi les 42 souches résistantes à 2 mg/l d'ofloxacine (définition OMS de la résistance aux fluoroquinolones), 6 (14%) restaient sensible à 2 mg/l de moxifloxacine.

- Résultats pour les 101 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 : 0-2 % à l'amikacine ou aux fluoroquinolones, 4% 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.

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), une stabilisation en 2013 (83 cas) puis une nouvelle **augmentation de 30% en 2014 (111 cas)**. L'année passée constitue celle où le CNR a reçu le plus grand nombre de souches MDR.

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, 22 en 2013 et **26 en 2014**. 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) et finalement **environ 20% depuis 2012**.

L'année passée constitue celle où le CNR a reçu le plus grand nombre de souches MDR ou XDR.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 7 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1^{re} et 2^e ligne des souches reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2014 pour antibiogramme de 2^e ligne, hors multirésistance (suspensions initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1^{re} ligne...)

Années (n souches)	2006 (41)	2007 (35)	2008 (38)	2009 (83)	2010 (81)	2011 (75)	2012 (67)	2013 (98)	2014 (101)
Ethambutol	nd	6	8	10	13	13	3	5	4
Streptomycine	nd	54	42	39	43	43	28	36	22
Amikacine	0	3	0	0	3	3	0	1	0
Fluoroquinolones	0	0	5	1	0	0	1	2	2
Ethionamide	14	21	29	52	59	59	66	40	62
PAS	6	11	10	10	11	11	3	8	8

Tableau 8 : Evolution de 2001 à 2014 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	82	83	100	22	27
2014	nd	111	nd	26	23

nd : enquête en cours, donnée disponible fin 2014

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 2012-2013 (n~50/an) et 2014 (n=60).

Le nombre de souches **MDR de patients nés en Géorgie est toujours en augmentation** en 2014 par rapport aux années précédentes : 1-4 /an en 2006-2010, 5 en 2011, 26 en 2012, 32 en 2013 et **40 en 2014**.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 9 : distribution des pays de naissance des cas de tuberculose MDR (souches 2006 à 2014)

Pays d'origine	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
France	11	5	6	6	4	8	9	5	12
Allemagne								1	
Norvège				1					
Portugal		2	2		2	1			2
Total Europe Ouest	11	7	8	7	6	9	9	6	14
Roumanie	2	1	5	1		6	3	3	9
Bulgarie								1	
Moldavie	1	1	1		1	1	1		
Féd. Russie hors Tchétchénie	2		1	2	1	7	6	2	4
Fédération Russie - Tchétchénie	1	1	5	3	4	4	8	3	1
Arménie	1	1	2	3		4	2	1	3
Azerbaïdjan					1				
Géorgie	2	1	1	4	1	5	26	32	40
Kosovo								1	
Lituanie								2	
Ukraine		2					4	2	4
Total Europe Est et ex. URSS	9	7	15	13	8	27	50	47	60
Algérie	1	3	2	1	1	3	1	2	1
Maroc		1		2		1	2	1	1
Tunisie						1	1	1	
Total Maghreb	1	4	2	3	1	5	4	4	2
Angola	1	1	1	1	2	1	1	1	1
Bénin							1	1	
Cameroun		2	2		2			2	1
Cap-Vert					1				
Congo	3	1	4	4	1		3		3
Côte Ivoire	5	1	2	3	2	2	1	1	2
Djibouti	1								
Egypte							1		1
Erythrée								1	
Ethiopie	1			1					
Ghana				1					
Guinée Conakry	3	1	2		2	1	1	2	1
Madagascar-Comores		1		1				1	
Mali				1					1
Mauritanie				1		1			
Niger			1						
Rep. Centrafricaine	1	1				1	2	1	2
RD Congo	4	5	1		2	5	5	4	6
Rwanda						1			
Sénégal	1		2	1	1		3	1	2
Soudan				1			1		
Tchad					1	1	1		
Togo	1							1	
Total Afrique hors Maghreb	21	13	15	15	14	13	19	16	19
Bangladesh							1		1
Cambodge			1						
Chine	1	1	1	2	1	1	3	1	1
Corée				2					
Inde	2			2		1	2		
Indonésie									1
Irak									1
Mongolie					2	1	1		
Népal	1							1	
Pakistan			1	1	1	2	2	1	
Sri Lanka		1							1
Syrie				1					
Thaïlande						1			1
Tibet		1			3			1	
Turquie								1	
Vietnam			1	2	2	1		2	3
Total Asie	4	3	4	10	9	7	9	7	9
Chili				1					
Haïti					1	1	1		
Equateur								1	1
Pérou	1	1			1			1	
Total Amériques	1	1	0	1	2	3	1	2	1
Non précisé								1	4
GRAND TOTAL	48	35	44	49	40	64	92	83	111



Les Figures 1 et 2 montrent (a) l'augmentation du nombre de souches MDR, (b) la place prépondérante des pays de l'ex-URSS dans les cas MDR, (c) et l'augmentation de la proportion des souches XDR parmi les souches MDR.

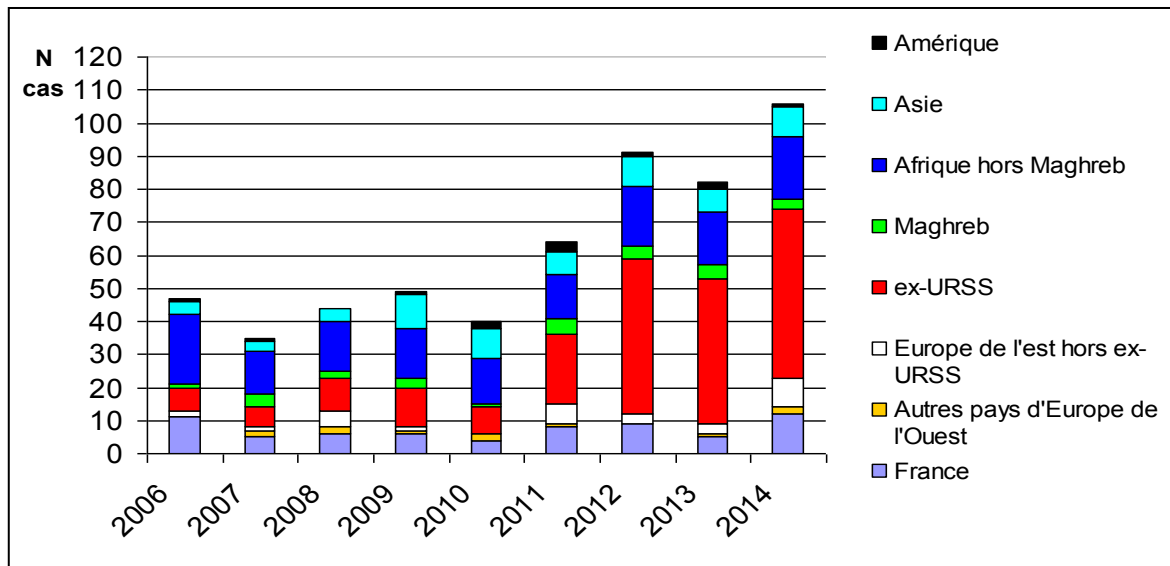


Figure 1 : évolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance

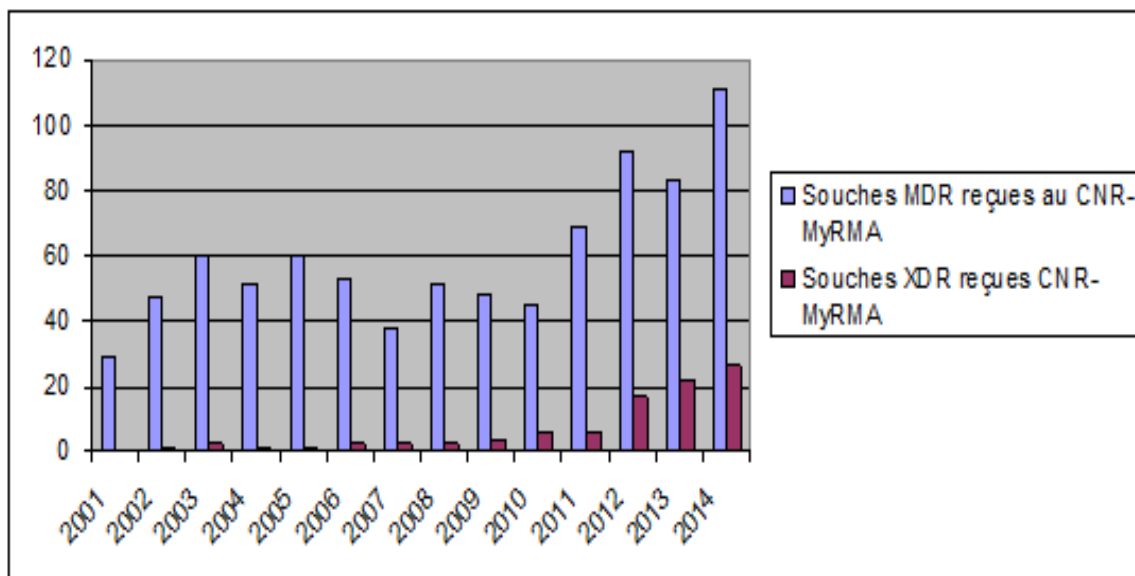


Figure 2 : évolution de la distribution des cas MDR et XDR

Le Tableau 10 montre que les patients d'ex-URSS représentaient 1/4 des cas de tuberculose XDR en 2004-2008, 2/3 des cas en 2009-2011, et la quasi-totalité des cas depuis 2012. Les patients **géorgiens représentent la quasi-totalité des cas XDR depuis 2013** (Tableau 10). Les autres patients XDR sont nés dans d'autres pays de l'ex-Europe de l'est, et rarement de France, d'autres pays d'Europe de l'ouest ou d'Afrique.



CNR-MyrMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Enfin, il faut noter que parmi les cas de patients atteints de tuberculose MDR et nés en Géorgie (n=40) enregistrés en 20, 50% (n=20) avaient une souche XDR, 23% (n=9) une souche pré-XDR alors que seulement 27% (n=11) avaient une souche MDR dite « simple » (sensible aux fluoroquinolones et aux aminosides de réserve).

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 2014

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique subsaharienne	Europe de l'Est et ex-URSS	Total
2004		1 (Algérie)			1
2005			1 (Mali)		1
2006	1 (France)			1 (Tchéchénie)	2
2007	1 (France)		1 (Congo)		2
2008				2 (Russie, Roumanie)	2
2009		1 (Algérie)		3 (2 Géorgie, Arménie)	4
2010	1 (Portugal)			5 (3 Tchétchénie, 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
2014	2 (France, Portugal)		1 (RD Congo)	23 (20 Géorgie, 3 Russie)	26*

* données non consolidées car antibiogramme non disponible pour une souche

Le **tableau 11** montre que la moitié des souches MDR de 2014 étaient envoyées de laboratoires de la **région Ile de France (n=58)** et que 5 souches au plus provenaient de chacune des autres régions, sauf PACA (n=6), Nord-Pas-de-Calais (n=7) et Rhône-Alpes (n=13).

Tableau 11 : Répartition par régions des laboratoires ayant envoyé l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR au CNR-MyrMA en 2014

Région	N souches reçues en 2014
Alsace	5
Aquitaine	1
Auvergne	
Basse-Normandie	1
Bourgogne	
Bretagne	
Centre	2
Champagne-Ardenne	
Corse	1
Franche-Comté	2
Guadeloupe	
Guyane	



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Haute-Normandie	5
Île-de-France	58
La Réunion	2
Languedoc-Roussillon	4
Limousin	1
Lorraine	
Martinique	
Mayotte	
Midi-Pyrénées	3
Nord-Pas-de-Calais	7
Pays de la Loire	
Picardie	1
Poitou-Charentes	
Provence-Alpes-Côte d'Azur	6
Rhône-Alpes	12
Total	111

Tendances évolutives 2006-2014 (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)**, s'est **stabilisé en 2013 (n=83)** puis a **nouveau augmenté en 2014 (n=111)**.

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, 22 en 2013 et enfin 26 en 2014.

La proportion de **souches XDR** parmi les **souches MDR** a donc **beaucoup augmenté**, de 2-3% pour la période 2002 - 2005, à 4-5% en 2006-07, 8% en 2009 et **environ 20% depuis 2012**.

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 environ 20 par an depuis 2011 (**n=21 en 2014**).

Il faut remarquer que la proportion des souches MDR identifiées par l'enquête systématique auprès des laboratoires du réseau CNR-MyRMA (cf. section 3) **et** qui ont effectivement été reçues au CNR-MyRMA pour études *in vitro* a augmenté entre les périodes 2001-02 (~ 60 %) et 2008-13 (90-100 %) (**Tableau 8**). **Le CNR-MyRMA reçoit donc la quasi-totalité des souches MDR de France.**

2.3.3. Tests phénotypiques de sensibilité des mycobactéries atypiques et tendances évolutives 2006-2014

Au total 312 souches de mycobactéries atypiques ont fait l'objet de tests de sensibilité aux antibiotiques en 2014.

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

***M.avium-intracellulare* complex** : parmi les 169 souches reçues en 2014, 94 (61 *M.avium* et 31 *M.intracellulare*, 1 *M.chimaera*) ont fait l'objet d'un antibiogramme dont 8 (8.5%) étaient résistantes à la clarithromycine (CMI > 16 mg/l en milieu 7H9). Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement, 5/50 avaient une souche résistante soit **10% de résistance secondaire**.

Sur l'ensemble de la période 2006 - 2014, la proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 8%, soit



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

95 souches sur les 1159 testées. Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement, 60/274 avaient une souche résistante soit **22% de résistance secondaire**.

M.xenopi : parmi les 40 souches reçues en 2014, 29 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 2014, seules 2 souches de *M.xenopi* ont été trouvées résistantes à la clarithromycine parmi les 277 souches testées (0,7%). Ces souches ont été isolées chez 2 des 45 patients ayant des antécédents de traitement (**5% de résistance secondaire**).

M.kansasii : Parmi les 9 souches reçues en 2013, 6 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante à la rifampicine. Entre 2006 et 2014, aucune des 173 souches reçues n'étaient résistantes à la rifampicine y compris pour les 16 patients ayant des antécédents de traitement (0 % de résistance secondaire).

Sur les 114 souches d'espèces à croissance rapide (11% de l'ensemble des souches identifiées) reçues, **98 (86%) correspondaient à des infections**, le plus souvent des infections respiratoires dans le cadre de la mucoviscidose (*M.abscessus* complex) et des infections cutanées et des tissus mous (*M.chelonae*, *M. fortuitum* et *M. abscessus* complex) mais aussi des infections disséminées chez des immunodéprimés (*M. fortuitum*).

Pour ces mycobactéries, un antibiogramme phénotypique par la méthode de microdilution est réalisé avec en plus un génotypage de résistance à la clarithromycine systématiquement pour les souches de l'espèce *M. abscessus* et un génotypage de résistance aux aminosides en cas de CMI très élevées (> 64/ml).

98 souches de mycobactéries atypiques à croissance rapide ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques

- Pour les 9 cas à *M. fortuitum*, les souches avaient une résistance à la clarithromycine en cohérence avec la présence naturelle d'un gène *erm* conférant une résistance inducible aux macrolides chez cette espèce.
- Pour les 16 cas à *M. chelonae*, les souches étaient toutes sensibles à la clarithromycine.
- Pour les 73 cas de *M. abscessus* complex le séquençage du gène *erm41* a été réalisé pour caractériser leur profil de sensibilité naturelle à la clarithromycine, la présence du gène *erm41* spécifique conférant une résistance naturelle, dont le séquevar C/T28 que nous avons décrit en 2011 (Bastian et al. 2011) détermine la caractéristique inducible ou constitutive de la résistance (cf section 2.2.5.). La proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 55/61 pour *M. abscessus* sensu stricto, 0/2 pour *M. massiliense*, 10/10 pour *M. bolletii*.

2.4. Détection de mutations impliquées dans la résistance acquise aux antibiotiques

2.4.1. Souches reçues pour détection de mutations

En 2014, 468 souches ont été soumises à la détection moléculaire rapide de mutations impliquées dans la résistance :

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

- **153 souches de mycobactéries atypiques** pour la clarithromycine et les aminosides.

- **31 souches de *M.leprae*** pour la rifampicine, les quinolones et la dapsonne.

En 2014, le CNR CNR-MyRMA était en mesure d'analyser 12 gènes impliqués dans la résistance 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 2006-2014

Au total en 2014 nous avons effectué **1710 tests génomiques pour recherche de mutations impliquées dans la résistance : 1452 pour *M.tuberculosis*, 165 pour les mycobactéries atypiques et 93 pour *M.leprae***. Le nombre de recherches avait doublé entre 2006 et 2011, puis avait augmenté de 29 % de 2011 à 2012. Après un repli passager en 2013, le nombre de recherches a atteint à nouveau, et a même dépassé (+ 8 %), le chiffre de 2012 (Tableau 12).

a. Mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis*, tendances évolutives 2006-2014

Tableau 12 : 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 2014

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>rpoB</i> (rifampicine)	184	197	276	254	201	232	284	267	281
<i>katG-ina</i> (isoniazide)	182	179	276	249	198	227	280	263	284
<i>pncA</i> (pyrazinamide)	142	138	172	164	137	183	217	211	225
<i>gyrA/gyrB</i> (Fluoroquinolones)	117*	105	150	129	128	183	231	215	232
<i>ethA/ethR</i> (éthionamide)	-	-	-	-	50	79	103	93	119
<i>rrs</i> (aminosides)	-	-	-	-	56	99	159	121	156
<i>emB</i> (éthambutol)	-	-	-	-	62	105	159	121	155
Total	625	619	874	796	832	1109	1433	1291	1452

* 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 126 des 281 (45%) tests réalisés en 2014** (Tableau 13).

La distribution des mutations étaient comme suit :

- **78 mutations S531L (62% des mutations)**

- 48 autres mutations (38% des mutations) réparties entre les codons 505 et 533 (tableau 13).

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 2014, toutes les souche résistante à la rifampicine avaient une mutation 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 13 : Distribution des mutations du gène *rpoB* identifiées dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2014 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	2014
S531L	26	29	34	41	37	58	76	66	78
H526Y	2	2	5	7	4	6	3	1	3
H526D	3	3	2	5	4	6	6		6
H526N ou T ou L ou S ou R ou C ou P	5	2		2	2	4	7	7	6
D516V	9	1	3	8	1	1	2	2	8
D516Y	4			2		3	2	4	4
Délétion N519				1		2			
L511P				1	3**			3	
Q513P						1	2		1
Q513K							1		
Q513E							1	1	
L521V							1		1
S522Q									1
S531W	1			3		2	1	1	3
S531F						1	1	4	4
L533P	3			2	3	2	1	2	9
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						1	1		1
Insertion				6					1
Mutation entre 510 et 533*		1	14	2					
Mutation entre 516 et 522°							3		
Total avec mutation	53	38	58	80	54	94	114	95	126
Pas de mutation	131	159	218	174	147	138	161	162	151
PCR négatives + ininterprétables ^a							9	10	4
Total général	184	197	276	254	201	232	284	267	281

* position de la mutation non précisée

** dont 1 avec en plus mutation S509I

° correspond au patient avec mutation L521V

^a nouvelle rubrique, non citée jusqu'en 2011



Isoniazide (INH)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBRplus, complété par le séquençage des gènes *katG*, *inhA* et du promoteur d'*inhA*, a permis d'identifier des mutations dans *katG* et *inhA* pour 152 des 284 (54%) souches testées en 2014 (Tableau 14) :

- 125 fois une mutation 315 dans *katG* (86%), toujours corrélée avec une résistance phénotypique à haut niveau à INH, dont 103 mutations isolées et 21 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA*. La mutation S315T isolée était la plus fréquente (n=123, 81%)
- 42 fois, une mutation de type « -15 c->t » dans la région régulatrice du gène *inhA* (28%), corrélée, lorsqu'elle est isolée (n=21, 14%), avec une résistance phénotypique à bas niveau à INH.

Tendances évolutives 2006-2014 : la part dominante de la mutation isolée S315T dans le gène *katG*, 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. On note en 2014 une augmentation significative du nombre de mutants avec une double mutation KatG S315T et promoteur *inhA* (n=21 en 2014 contre n=6 en 2013). 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 14 : Distribution des mutations des gènes *katG* et *inhA* dans les souches de *M.tuberculosis* complexe étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2014 pour détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide (techniques : GenoType®MTB-DRplus et séquençage des gènes *katG*, *inhA* et promoteur du gène *inhA*)

Mutation	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
KatG S315T	73*	58*	54	73	49	76	101	106	102
KatG 315 autre que S>T	1*	2*	1	2	-	3	1	1	1
KatG autre que S315	7	6	9	14	7	12	10°	7	5
Promoteur <i>inhA</i>	12	27	17	28	24	21	13	22	21
dont -15	12	27	16	28	24	20	13°	22°	21°
InhA	2	1		2	1**	2		4	1
KatG S315T et promoteur <i>inhA</i>	nd*	nd*	12	9	8	10	9	6	21
Autre combinaison KatG et InhA				1					1
Total mutations	95	94	93	129	89	124	132	146	152
Pas de mutation	87	85	183	120	109	103	140	112	119
PCR négatives + ininterp. ^a							8	5	13
Total général	182	179	276	249	198	227	280	263	284

* 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

^a 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 **225 souches en 2014** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).

Parmi les 225 souches, 74 (33%) avaient une mutation du gène *pncA* (**Tableau 15**) dont 5 *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 15 : Distribution des mutations du gène *pncA* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA entre 2012 et 2014 pour détection moléculaire de la résistance au pyrazinamide (technique : séquençage du gène *pncA*)

Mutation	N 2012	N 2013	N 2014
L4W ou S	1	4	1
I5T		1	
I6L	1	1	
V7A	1	1	1
D8G ou E			2
V9A ou G	1	2	
V9G	1		
Q10H ou R	1		1
D12Y ou A			2
G17C	1		
I31S			1
H43Y		1	
T47P ou A		4	2
D49G ou A	1	1	
H51R ou P		1	1
H57D*	6	3	5
H57R			1
F58L	2	1	
P62T		1	
D63A			2
W68		1	
Y64D			1
H71R ou Y ou P	2	4	9
S67P			1
L85R ou P	2	1	1
T87M	2	1	1
F94L			1
Y95STOP	1		
K96Q ou T	2	2	
G97C ou S ou R ou D	1		4
Y99S			1
A102V		1	



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Y103STOP	1		
S104R	2		
F106S			1
G108R	1		
L116R	2		
W119L ou C ou R		2	2
L120R ou P		1	1
R121P			1
V128G		1	
G132D	1		
C138R		1	
T135P			3
V139M ou A	2	3	
Q141P		3	
R140S			2
Q141P			5
T142R ou M		3	
A146T ou V	2		3
L159R	3		
T160K		1	
T167I	4	1	2
M175V ou T ou K	1	2	2
P77L + V131G		1	
Délétion dans pnca :	8	4	4
Insertion dans pnca :	5	5	7
Codon stop			1
Total mutations	58	59	72
PCR négatives	3	7	5
Pas de mutation	156	145	148
Total général	217	211	225

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

Fluoroquinolones (FQ)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBRsI, complété par le séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour l'ADN gyrase, cible des fluoroquinolones, a été effectué **pour 232 souches reçues en 2014** (souches MDR, souches suspectes d'être MDR, par exemple, après rechute).

Des **mutations (Tableau 16)** ont été détectées chez **51 des 232 souches (22%)** dans **GyrA** (48 cas) ou **GyrB** (2 cas) ou dans **GyrA et GyrB** (1 cas), incluant 46 souches MDR résistantes aux quinolones (dont 26 XDR et 17 pré-XDR). On note : 1 souche MDR résistante aux quinolones et qui porte une mutation dans GyrB (D500V), 1 souches sensible aux quinolones et qui porte une mutation dans GyrB (G551R) et 5 souches sensibles aux quinolones qui portent un polymorphisme de *gyrA* ne conférant pas la résistance (T80A).

Les codons dominant dans GyrA étaient les codons 94 (n=29, 59%) et 90 (n=13, 27%).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 16 : Distribution des mutations des gènes *gyrA* et *gyrB* dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA de 2006 à 2014 pour détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones (technique : séquençage)

Gène	Mutation*	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>gyrA</i>	T80A**		2	2	3	5	3	1	2	5
	G88C ou A		1						1	1
	D89N					1				
	A90V	2	1	2	2	3	3	7	11	12
	S91P				2	1	3			1
	D94A			3		3	3	7		
	D94H			1	1		2			
	D94G	4***		3	1	2	1	8	12	22
	D94N	1			2		1	4		5
	D94Y				1	1	3		1	2
	Q101E				1					
	T80A** + A90G	3							2	
	T80A** + A90E		1							
	A90V + D94Y				1					
	A90V + D94V						3			
	A90V + D94H							2		
<i>gyrB</i>	S470I					1				
	R467P**								1	
	P478A**			1				1		
	R485H		1							
	S486Y				1		1			
	D500A ou V			1						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					1
	G559A**		2				2	1	1	
	R485C + A543V							1		
<i>gyrA</i> + <i>gyrB</i>	D94A + A543V							1	1	
	A90V + A543V									1
Total mutations		10	8	13	21	20	28	36	33	51
Pas de mutation		107	97	137	108	108	155	194	175	177
Résultats non interprétables ^a								6	7	4
Total général		117	105	150	129	128	183	231	215	232

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

^a nouvelle rubrique, non citée jusqu'en 2011



Ethionamide (ETH)

Le séquençage des gènes *ethA* et *ethR*, codant pour la monooxygénase EthA et son régulateur EthR, a été effectué pour 119 souches en 2014. Des mutations (Tableau 17) ont été détectées chez 38 souches (32%). On note une grande diversité des mutations dans EthA.

Tableau 17 : Distribution des mutations des gènes *ethA* et *ethR* dans les souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyRMA en 2014 pour détection moléculaire de la résistance à l'ethionamide (technique : séquençage)

Gène <i>ethA</i>	EthA EthR	2012	2013	2014
	G11D ou S	1	1	2
	H22P	1		
	C27W		1	
	G42V + P334A	1		
	F48S		1	
	Y50C		1	
	S55C		1	
	G63D		1	
	F66L + G199D	1		
	G78D + wt	1		
	D95N			1
	R99G	1		
	L136R			1
	Y140STOP	2		
	Y147STOP	1		
	Q165P	4	1	
	H166P		1	
	W167G	2	1	
	I178S			1
	S183R			1
	Q206STOP	1		
	S208STOP	1	1	
	Y211S		1	
	V238G	1	1	1
	R239L			1
	P257S		2	
	R261W	1		
	S266R		3	2
	Q269STOP	2	2	1
	H281P		1	
	C294Y			1
	I305N	1		
	I337V		1	
	I338S		1	
	T341I		1	
	M372R		1	



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

	N379D		1	
	G385D	2		
	C403R	1		
	G413D			1
	P422L		1	
	L440P		1	1
	Q449R	1		
	D464G		1	
	R483T	1		
	Délétion + I337V	1		
	Délétion + D95N			2
	Délétions	12	13	17
	Insertions	6	5	3
ethR	T149A	1		
	M102T + délétion ethA			1
Zone intergénique	-68 A->G	3		1
	-66-65 ins CG	1		
Total mutations		51	46	38
Pas de mutation		49	42	74
PCR négatives ^a		3	3	7
Total général		103	91	119

*Numérotation de *E.coli*

^a 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, **156 souches ont été étudiées en 2014**. Les résultats montrent la présence d'une **mutation** a1401g pour 9 d'entre elles (6%), dont 6 XDR et 2 MDR. Une mutation c1402t a été trouvée dans une souche XDR et g1484t dans 2 souches XDR. Comme attendu, aucune des 17 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'ethambutol. Au total, **155 souches ont été étudiées en 2014**, montrant la présence d'une **mutation** du codon EmbB-306 pour **49 d'entre elles** (32%) : M306V (n=29) et M306I (n=20).

b. Mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries atypiques

En 2014, **153** souches de mycobactéries atypiques ont été soumises à la détection moléculaire rapide de la résistance.

Espèces à croissance lente (79 souches) :

- résistance acquise à la clarithromycine parmi 78 souches: mutations de la région autour des nucléotides 2057 et



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

2059 du gène *rrl* codant l'ARN 23S : 6 souches (8%) portaient une mutation 2057 A>C (*M.avium*, n= 1), 2058 A>G (*M.avium* n= 3 ; *M.simiae* n=1), et 2059 A>C (*M.avium* n= 1).

- résistance acquise aux aminosides par mutation du gène *rrs* codant l'ARNr16S : 1 souche de *M.intracellulare*) portait une mutation A1401G.

Espèces à croissance rapide (74 souches) :

- résistance naturelle à la clarithromycine de 55/61 *M. abscessus* sensu stricto, 0/2 *M. massiliense*, 10/10 *M. bolletii*, liée à la présence du gène *erm41* spécifique conférant une résistance intrinsèque, dont le sequevar C/T28 que nous avons décrit en 2011 (Bastian et al. 2011) détermine la caractère inductible ou constitutif de la résistance.

- résistance acquise constitutive à la clarithromycine par mutation du gène *rrl* (ARNr23S) pour 8 souches de *M. abscessus* sensu stricto *erm41* sequevar T28 : 4 souches avaient en positions A2058G ou A2058C), provenant de patients atteints de mucoviscidose dont 1 transplanté pulmonaire.

- résistance acquise aux aminosides par mutation du gène *rrs* (ARNr 16S) pour 5 souches (4 souches de *M. abscessus* dont 3 avec des CMI de l'amikacine ≥ 64 mg/L) et 1 souche de *M. chelonae* : 1 souche de *M. abscessus* sensu stricto avait une mutation A1408G conférant une résistance de haut niveau à l'amikacine et provenait d'un patient atteint de mucoviscidose déjà traité pour une infection à *M. abscessus*.

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

En 2014, nous avons reçu **87 prélèvements pour diagnostic de lèpre (Tableau 18)**, soit presque le double du nombre de 2013. Pour 36 prélèvements (42%), l'examen microscopique était positif et 1 prélèvement était négatif à l'examen microscopique mais positif en PCR. Ces prélèvements positifs correspondaient à **31 patients : 26 nouveaux cas et 5 rechutes** :

- chez 14 patients prélevés à Mayotte (tous des nouveaux cas) dont 5 no originaires de Mayotte, 2 des îles des Grandes Comores et 7 de l'île d'Anjouan;
- chez 1 patient à la Réunion (rechute); 2 patients à Tahiti (rechutes)
- chez 14 patients (12 nouveaux cas et 2 rechutes) vus en consultation ou hospitalisés en métropole (1 nouveau cas à Paris-Pitié-Salpêtrière, 4 nouveaux cas à Paris-Saint Louis, 1 nouveau cas à Bicêtre, 1 nouveau cas à Bobigny, 1 nouveau cas à Dijon, 1 nouveau cas à Marseille, 1 nouveau cas à Rouen, 1 nouveau cas à Saint Mandé, 1 cas à Tenon (rechute), 1 cas à Toulouse (rechute) et 1 nouveau cas à Lille. Tous étaient immigrants de pays ou régions où la lèpre est encore présente (Sri Lanka, Brésil, Inde, Comores, Congo, Madagascar, Mayotte, Guadeloupe, Mali) ou y ayant longtemps séjournés (Nouvelle Calédonie, Congo).

Les résultats de détection moléculaire de résistance (amplification-séquençage des gènes *rpoB*, *folP* et *gyrA*, Genotype Lepae DR) ont été les suivant :

- pour les 26 nouveaux cas (recherche de résistance «primaire»), toutes les souches ont été considérées comme sensibles (pas de mutation) à la rifampicine, aux sulfones et aux quinolones.
- pour les cas de rechute, les 5 souches étaient sensibles aux antilépreux (pas de résistance «secondaire»).

En 2014, 2 primo cultures ont été effectuées chez la souris. Une culture *in vivo* a été négative chez la souris nude (pas de multiplication chez les animaux témoins), l'autre est actuellement en cours.

Les 2 antibiogrammes effectués chez la souris pour deux souches de 2013 ont confirmé leur sensibilité à la rifampicine, comme attendu par le diagnostic moléculaire.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tendance évolutive 2007-2014

Le nombre de prélèvements pour suspicion de lèpre chez des patients vus en France (métropole ou DOM-TOM) et reçus au CNR-MyRMA a beaucoup augmenté durant les 7 dernières années : entre 10 et 20 par an entre 2007 et 2010, 50 par an entre 2011 et 2013 et 87 en 2014, grâce aux efforts de relations entre le CNR et les collèguyes métropolitains et des TOM-DOM, en particulier de Mayote. Le nombre de cas confirmés de lèpre a augmenté d'une moyenne de 5 entre 2007 et 2010 à une moyenne de 25 entre 2011 et 2014. Au total, sur les 112 cas positifs testés durant les 7 dernières années, 7 étaient résistants aux sulfamides (dapsone) (6% de résistance), 2 aux quinolones et 1 à la rifampicine (**Tableau 18**).

Tableau 18 : récapitulatif 2007-2014 des prélèvements reçus au CNR-MyRMA pour diagnostic de lèpre

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
N total reçus	10	18	17	25	51	51	45	87
N prélèvements positifs pour <i>M.leprae</i> :	2	7	6	7	22	24	25	37
N cas de lèpre	2	7	6	7	22	24	24	31
Nouveau cas	0	5	5	6	9	20	18	26
Rechutes	2	2	1	1	13	4	6	5
Lieu du diagnostic								
France Métropolitaine	0	2	2	4	10	8	6	14
DOM-TOM	2	5	4	3	12	16	18	17
Pays d'origine des patients								
DOM-TOM	2	5	2	5	14	16	20	12
Afrique		1	2	1	8	4		12
Asie-Océan Indien		1		1		3	1	4
Amérique						1	1	1
Europe			2				1	2*
Résistance aux antiléproux								
Dapsone	0/2	1/4	1/6	1/7	1/19	1/19	2/24	0/31
Rifampicine	0/2	0/4	0/6	0/7	1/19	0/19	0/24	0/31
Ofloxacine	0/2	0/3	1/6	0/7	0/19	0/19	1/24	0/31

*: patients ayant séjourné en zone d'endémie (1 Nouvelle Calédonie, 1 Congo)



3. Activités de surveillance

3.1. Surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux

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

Les données recueillies en 2014 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2013 par 37 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries. Deux laboratoires ne réalisent plus les analyses de mycobactéries mais adressent ces analyses à un autre CHU du réseau qui sont donc toujours comptabilisées dans le réseau Azay-Mycobactéries. Un autre laboratoire n'a pas été en mesure de fournir les données pour l'année 2013. Par ailleurs, le nombre de cas enregistrés dans la région Aquitaine est plus faible que les années précédentes car le laboratoire n'a cette fois inclus que les cas hospitalisés au CHU, et non tous les cas analysés par le laboratoire. Le nombre de cas enregistrés dans la région Bretagne est plus élevé en 2012 et 2013 que les années précédentes car le CHU de Rennes participe maintenant aux activités du réseau.

Les 37 laboratoires du réseau ont colligé en 2013 les données concernant 1547 cas de tuberculose à culture positive, soit un chiffre très proche de ceux générés par le réseau depuis 2007. Un test de sensibilité à au moins rifampicine et isoniazide a été réalisé pour 1530 des 1547 (99%) cas colligés. La distribution des cas par région est donnée dans le Tableau 19).

Tableau 19 : Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie de 2006 à 2013 : distribution régionale des cas à culture positive. Pour 2013, 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	2013	
								N	%
Alsace	41	35	40	50	39	55	36	37	2,4
Aquitaine	144	116	106	126	132	141	111	46	3,0
Auvergne	0	29	23	29	18	21	17	21	1,4
Bourgogne	15	23	29	24	17	22	19	22	1,4
Bretagne	16	14	22	17	12	15	64	67	4,3
Centre	21	18	24	15	12	32	22	25	1,6
Champagne Ardennes	19	6	16	15	13	13	13	17	1,1
Corse	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Franche-Comté	16	16	17	12	11	10	18	14	0,9
Ile de France	702	712	712	780	747	773	820	825	53,3
Languedoc-Roussillon	67	57	53	31	42	45	52	17	1,1
Limousin	16	13	23	14	14	22	13	22	1,4
Lorraine	25	28	36	28	23	33	22	25	1,6
Midi-Pyrénées	49	91	57	55	0	0	0	0	0
Nord-Pas de Calais	47	35	35	44	42	51	42	34	2,2
Normandie Basse	34	25	34	34	31	31	38	25	1,6
Normandie Haute	49	41	40	36	39	19	28	52	3,4
Provence ACA	0	37	39	38	61	44	40	50	3,2
Pays de Loire	69	74	79	63	71	85	74	75	4,9
Picardie	28	24	26	22	20	28	18	31	2,0
Poitou-Charentes	16	16	18	23	17	18	16	16	1,0
Rhône-Alpes	135	139	141	117	126	123	113	126	8,2
TOTAL	1509	1549	1570	1574	1487	1581	1576	1547	100



Caractéristiques générales des cas de tuberculose recensés

La proportion des cas de tuberculose à culture positive étudiés par le réseau Azay-mycobactéries en 2013 en fonction des **antécédents de traitement** (7,8% déjà traités), du **pays de naissance** (64% nés à l'étranger) et du **statut VIH** (5,8%) est présentée dans la Figure 3.

L'analyse de l'évolution depuis 1995 montre :

- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de la **proportion des cas diagnostiqués chez des patients ayant des antécédents de traitement** ce qui est en faveur d'une prise en charge convenable de la tuberculose en France (**indicateur de qualité**),
- une **augmentation continue 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 64% en 2013,
- une **légère tendance à la baisse, de la proportion des cas diagnostiqués chez les patients VIH+, actuellement inférieure à 6%**, 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 maintenant très modeste.

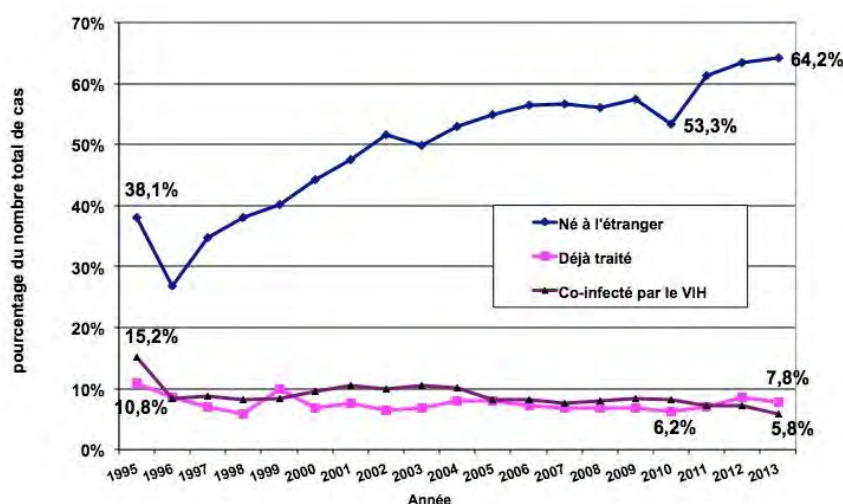


Figure 3 : Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2013

Pour les 1530 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 20**).

Pourcentage global de résistance « primaire »

Chez l'ensemble des 1221 malades sans antécédent de traitement (nouveaux cas), le pourcentage de résistance ("résistance primaire") à au moins un des 4 antituberculeux de première ligne était en 2013 de 10,3% (**Tableau 20, Figure 4**). Ce chiffre est en très légère augmentation depuis 1995 mais quasi stable depuis ces 5 dernières années.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 20 : Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2013 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	%
Testées	1221	100	400	100	781	100	118	100	21	100	94	100
Sensible	1095	89,7	364	91,0	694	88,9	73	61,9	19	90,5	52	55,3
Résistant	126	10,3	36	9,0	87	11,1	45	38,1	2	9,5	42	44,7
- dont résistant au moins												
SM	88	7,2	26	6,5	60	7,7	37	32,2	1	4,8	35	38,5
INH	69	5,6	22	5,5	47	6,0	38	32,2	0	0	37	39,4
RMP	24	2,0	4	1,0	20	2,6	34	28,8	0	0	34	36,2
EMB	15	1,2	1	0,3	13	1,7	26	22,0	1	4,8	25	26,6
- dont monorésistant à :												
SM	51	4,2	13	3,3	36	4,6	4	3,4	1	4,8	3	3,2
INH	25	2,1	9	2,3	16	2,1	1	0,9	0	0	1	1,1
RMP	2	0,2	1	0,3	1	0,1	2	1,7	0	0	2	2,1
EMB	3	0,3	0	0	2	0,3	1	0,9	1	4,8	0	0
- dont MDR	21	1,7	3	0,8	18	2,3	32	27,1	0	0	32	34,0

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

Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 191 cas et le pays de naissance était inconnu pour 93 cas
Pour 17 souches, les antibiogrammes n'ont pas été réalisés. La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 8 cas et l'éthambutol pour 14 cas

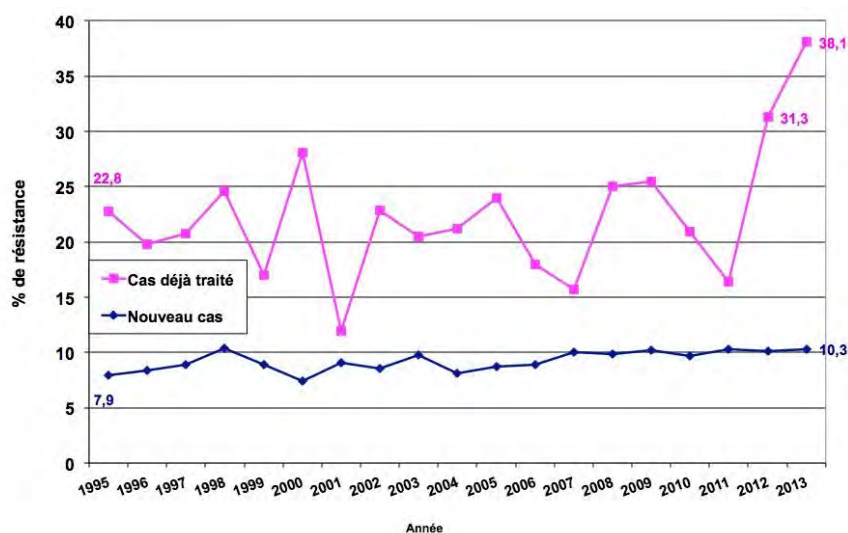


Figure 4 : Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance primaire) et les cas déjà traités (résistance secondaire). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2013

Le pourcentage de résistance primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (Figure 5, Tableau 20) était beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 5,6%) et la streptomycine (SM 7,2%) que pour la rifampicine (RMP 2,0%)



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

et l'éthambutol (EMB, 1,2%). Le **pourcentage de résistance primaire à l'INH en 2013 est inférieur à ceux de 2011 (6,7%) et 2012 (6,5%) mais légèrement supérieur à celui de 2010 (5,4%)**, et significativement plus élevé qu'au début de la surveillance (3,7% en 1995). Pour plus de détails voir le rapport 2012 et la publication afférente. **Ceci confirme l'importance de maintenir en France les recommandations thérapeutiques de quadrithérapie pour les nouveaux cas.**

Comme les années précédentes, la quasi-totalité des souches résistantes à la rifampicine rapportées en 2013 chez les patients sans antécédent de traitement (21/24) étaient aussi résistantes à INH (multirésistance). Deux souches étaient monorésistantes à RMP et une souche était résistante à RMP, EMB et SM. La proportion de cas **multirésistants « primaires »** mesuré en 2013 au travers du réseau Azay-mycobactéries (1,7%) reste supérieure à celles de 2009 (1,0%), et 2010 (1,1%), mais légèrement inférieure à celle de 2011 (1,9%) et 2012 (2,2%).

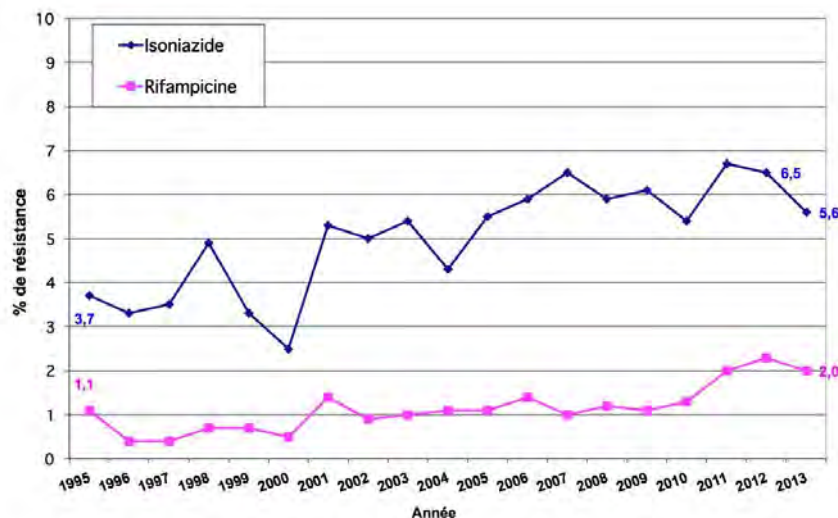


Figure 5 : Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2013

Résistance primaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance primaire à au moins un des 4 antituberculeux chez les 400 malades nés en France (Tableau 20) était de 9,0% alors qu'il était de 11,1% chez les 781 nés à l'étranger ($p < 0,27$). **Les pourcentages de résistance primaire restaient cependant globalement plus élevés chez les 781 malades nés à l'étranger que chez ceux nés en France** pour les résistances combinées mais pas pour la monorésistance à INH ou RMP.

Pourcentage global de résistance « secondaire »

Chez les 118 malades ayant déjà reçu un traitement antituberculeux (cas déjà traités), le pourcentage de résistance (résistance "secondaire" ou "acquise") à au moins un des 4 antituberculeux était de 38,1%, soit près de 4 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas (Figure 4, Tableau 20). Ce pourcentage est le plus haut observé 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 2013 (32,2%) est aussi le plus haut depuis 1995 comme cela est le cas pour le pourcentage de résistance secondaire à RMP (28,8%) (Figure 6). Comme en 2012, ces augmentations importantes sont liées à l'augmentation du nombre de cas de tuberculose à bacilles MDR qui représentent 32 des 118 cas (27,1%) de tuberculose chez les malades ayant déjà reçu un traitement (19,9% en 2012).

Résistance secondaire et pays de naissance

Comme en 2012, l'ensemble des 32 cas de tuberculose à bacilles MDR « secondaire » ont été diagnostiqués chez des malades nés à l'étranger (Tableau 20) et la résistance « secondaire » à chacun des quatre antituberculeux était très rare 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 deux souches également chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Une seule de ces souches monorésistantes RMP a été isolée chez un malade né en France.

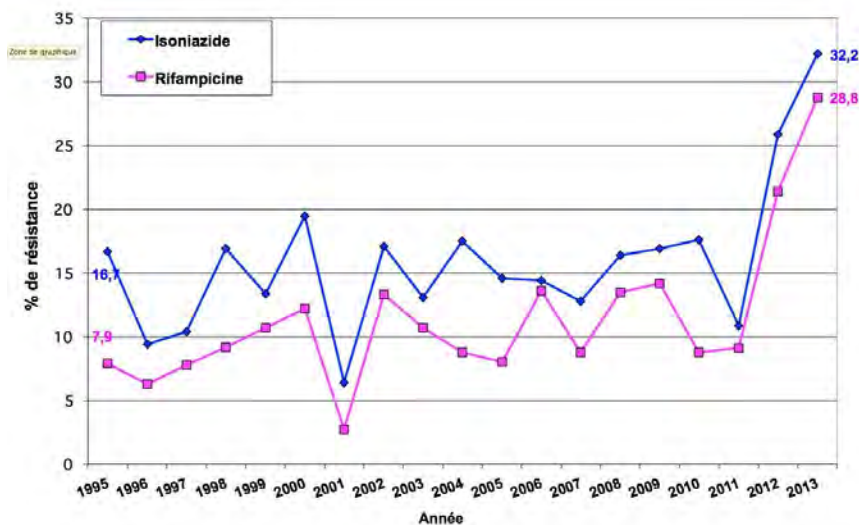


Figure 6 : Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2013

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

En 2014, le CNR-MyRMA a recueilli, à travers son réseau de près de 260 laboratoires, des données concernant les cas de tuberculose à culture positive **diagnostiqués en 2013**. Comme chaque année, les données ne sont pas tout à fait complètes au moment de rédiger le rapport d'activité (79% de réponse au questionnaire). Il faut noter qu'en 2013, 20 laboratoires du réseau ont arrêté leur activité de mycobactéries (17 en 2012), et que l'ensemble de ces laboratoires transfèrent leurs demandes d'analyses à d'autres laboratoires participant déjà au réseau du CNR-MyRMA.

Les données colligées à ce jour **concernent 4235 cas de tuberculose à culture positive**.

La région Ile-de-France a diagnostiqué un peu moins de la moitié des cas documentés de 2013 (42%) et la région Rhône-Alpes 17%. Chacune des autres régions représentent de 0% (6 régions sans aucun cas) à 6% (4 régions avec au moins 4 cas) du total des cas.

Comme les années précédentes, **plus de la moitié des cas (57% en 2013) de tuberculose documentés en 2013 était concentrée dans les 20 laboratoires dont l'activité est la plus importante (Figure 7) :**

- ✓ 15 laboratoires de CHU (8 d'Ile de France et 7 d'autres régions),
- ✓ 2 hôpitaux généraux d'Ile-de-France
- ✓ l'institut Pasteur de Guyane
- ✓ 2 gros laboratoires privés

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

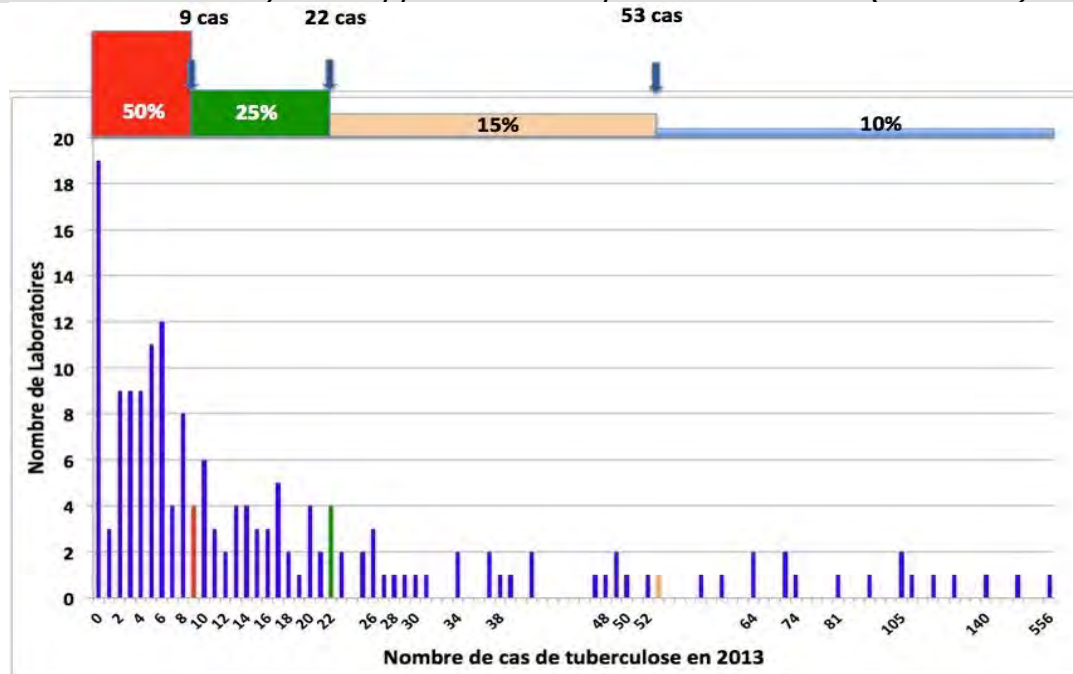


Figure 7 : Distribution des laboratoires du réseau du CNR-MyRMA en fonction du nombre de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2013

Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants en 2013

Le nombre de **cas de tuberculose à bacilles multirésistants** diagnostiqués en France par les 204/258 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour était de **82 en 2013**, ce qui représente une proportion de **1,9 (1,6%-2,4%)** des 4235 cas colligés (**Tableau 21**).

Parmi ces 82 cas MDR, il y avait un cas diagnostiqué dans les DOM et 2 cas chez des patients déjà identifiés les années précédentes (cas à rechutes) et 79 cas diagnostiqués pour la première fois en 2013 en métropole.

Le pourcentage de cas MDR (1,9%) calculé sur les 4235 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 1530 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les 37 laboratoires universitaires du réseau Azay-Mycobactéries (4,0% en cumulant les cas de résistance 1^{ère}, 2^{ème} et les cas avec antécédents inconnus ou douteux). Cette différence peut être expliquée par le caractère spécialisé et de « recours » des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU.

Comme chaque année, quelques laboratoires du réseau CNR-MyRMA n'ont pas encore adressé les données 2013 malgré de nombreuses relances ; toutefois, il est peu probable que le nombre total de cas multirésistants diagnostiqués en France en 2013 augmente avec les réponses de ces derniers laboratoires car tous les nouveaux cas de métropole correspondants aux souches MDR reçues par le CNR-MyRMA pour confirmation et antibiogramme complémentaire (cf. plus haut « activités d'expertise ») ont déjà été identifiés. La proportion définitive des cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2013 devrait être en revanche très légèrement inférieure à 1,9% 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 21**), la proportion de cas multirésistants rapportée au total des cas de tuberculose bactériologiquement prouvés était en 2013 comprise entre 0 et 5,6%.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 21 : Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2013 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA

Région	Total cas	Cas MDR	
		N	%
Alsace	75	5	5,5
Aquitaine	120	2	0,9
Auvergne	23	0	0
Bourgogne	36	0	0
Bretagne	155	6	3,9
Centre	85	1	1,2
Champagne Ardennes	43	0	0
Corse	16	0	0
Franche-Comté	18	1	5,6
Ile de France	1827	35	1,9
Languedoc-Roussillon	85	4	4,3
Limousin	29	0	0
Lorraine	45	1	2,2
Midi-Pyrénées	102	1	1,0
Nord-Pas de Calais	199	1	0,5
Normandie Basse	38	0	0
Normandie Haute	65	2	3,1
Provence ACA	229	4	1,7
Pays de Loire	100	1	1,0
Picardie	53	2	3,8
Poitou-Charentes	43	1	2,3
Rhône-Alpes	733	14	1,9
Départements d'outre-mer	116	1	0,9
Total	4235	82	1,9

Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants de 2013

Les caractéristiques des 79 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2013 en métropole sont les suivantes (n.b. les toutes petites différences d'effectifs et de distribution par pays de naissance, comparativement à celle des souches MDR reçues en 2013 au CNR-MyRMA, cf tableau 9, sont dues au fait que quelques souches reçues ne correspondent pas à des nouveaux cas de 2013) :

- 81% sont des hommes
- 5 (6,4%) sont nés en France, et 73 (92,4%) à l'étranger,
- parmi les 73 malades nés à l'étranger, 45 sont nés en Europe de l'Est (dont 33 en Géorgie), 15 en Afrique subsaharienne, 3 au Maghreb, 8 en Asie, et 2 en Amérique du Sud
- l'âge médian est de 34 ans (1 cas de moins de 5 ans, 0 cas de plus de 60 ans, 20% de 15 à 24 ans et 30% de 25 à 34 ans),
- 7 (9%) sont séropositifs pour le VIH, 82% sont séronégatifs et 9% de statut VIH inconnu,
- 91% des cas ont une atteinte pulmonaire de leur tuberculose,
- 47% n'ont jamais été traités (MDR « primaire »).

Tendances évolutives 1992-2013

Le pourcentage de cas multirésistants de 2013 est légèrement inférieur à celui de 2012 mais supérieur à celui de 2011. C'est le deuxième pourcentage le plus élevé, après celui de 2012 depuis le début de la surveillance en 1992. Durant les 19 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau 22), le pourcentage de cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en France est



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

passé de 0,4-0,7% entre 1993 et 1998 à 0,9% en 1999-2001 et entre 1,1 et 1,4 % depuis 2002, 1,7% en 2011 2,3% en 2012 et 1,9% en 2013.

Tableau 22 : Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2013)

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	4073	2,3	[1,9-2,8]
2013*	82	4235	1,9	[1,6-2,4]

*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 2007-2013 (**Tableau 23**) pour la majorité des régions. Les exceptions importantes en 2012 sont la région **Rhône Alpes** pour laquelle le nombre annuel de cas est passé de **5-6 entre 2006-2010 à 14 en 2011 et 2013 et 11 en 2012**, et la région **Provence-Côte d'azur** pour laquelle le nombre annuel de cas est passé de **1-4 entre 2006-2010 à 9 en 2011 mais 5 en 2012 et 4 en 2013**, la région **Bretagne** pour laquelle le nombre annuel de cas est passé de **0-3 entre 2006-2011 à 5 en 2012 et 6 en 2013**. En revanche pour la région **Poitou-Charentes** le nombre de cas en 2013 est semblable à celui de la période **2006-2011 (0-1 cas)** et plus faible que les 5 cas de 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 et 35 en 2013**.

Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont beaucoup modifiées durant les 19 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (**Tableau 24**). Il faut noter entre 1992 et 2011 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 2012-13, il y avait par rapport aux cinq années précédentes un retour à une très grande majorité de cas de sexe masculin et plus de cas nés en Europe et sans antécédents de traitement, en raison de l'augmentation de cas de résistance 1^{ère} chez des hommes nés en Géorgie.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 23 : Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2007 à 2013 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA

Région	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	TOTAL	% total
Alsace	0	2	1	2	3	4	5	17	3,8
Aquitaine	0	1	1	1	0	2	2	7	1,6
Auvergne	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Bourgogne	0	0	0	1	1	0	0	2	0,4
Bretagne	1	2	3	0	2	5	6	19	4,3
Centre	0	1	0	0	1	3	1	6	1,3
Cham. Ardennes	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Corse	0	3	2	1	0	0	0	6	1,3
Franche-Comté	0	0	0	0	0	2	1	3	0,7
Ile de France	28	31	30	23	36	40	35	223	49,9
Languedoc-Roussillon	1	2	0	2	2	4	4	15	3,4
Limousin	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Lorraine	2	0	0	0	1	1	1	5	1,1
Midi-Pyrénées	1	0	1	0	0	1	1	4	0,9
Nord-Pas de Calais	1	1	1	1	1	5	1	11	2,5
Normandie Basse	1	0	0	3	1	0	0	5	1,1
Normandie Haute	3	0	0	1	1	0	2	7	1,6
Provence ACA	1	2	1	4	9	5	4	26	5,8
Pays de Loire	0	2	2	0	2	3	1	10	2,2
Picardie	0	1	0	1	0	2	2	6	1,3
Poitou-Charentes	0	1	1	0	0	5	1	8	1,8
Rhône-Alpes	5	7	5	5	14	11	14	61	13,7
Dép. d'outre-mer	0	1	0	2	1	1	1	6	1,3
Total	44	57	48	47	75	94	82	447	100,0

L'Ile-de-France cumule la moitié du total des cas MDR en 2013 (**Figure 8**). Cependant cette proportion a tendance à diminuer depuis 2006-2007 car elle était auparavant proche de 2/3.

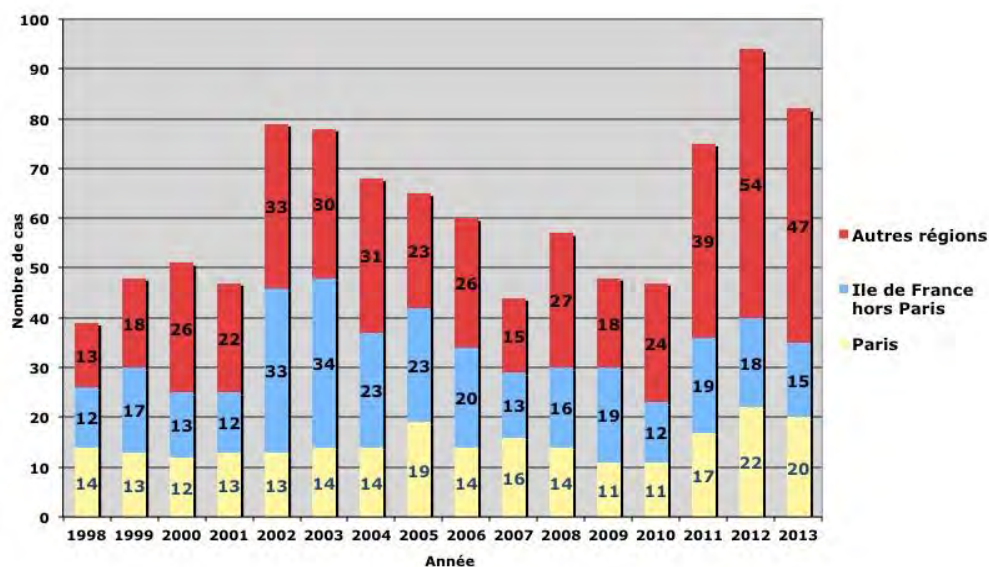


Figure 8 : Evolution de la distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants selon la région du laboratoire signalant le cas : Paris, Ile de France, autres régions, 1998-2012



Tableau 24 : Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 2006 à 2013

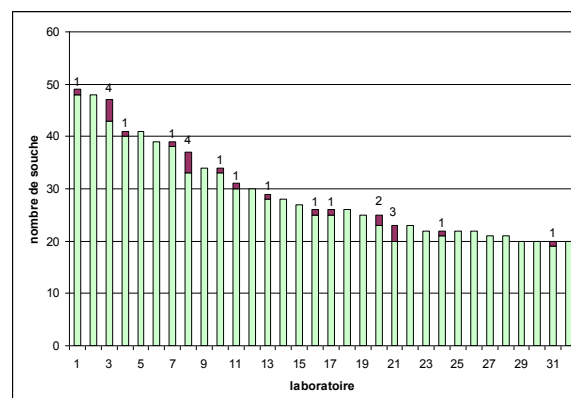
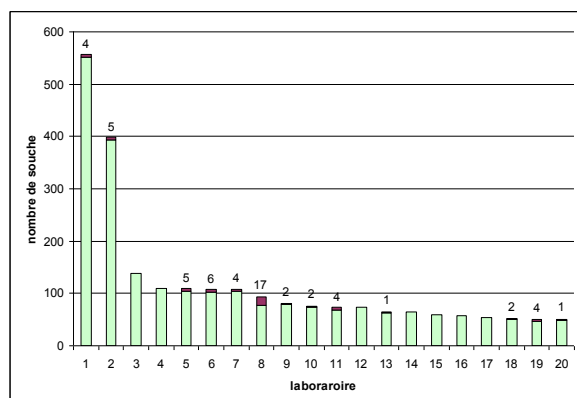
Caractéristiques	Période				
	1992-1996	1997-2001	2002-2006	2007-2011	2012-2013
N total de cas recensés, dont :	215	211	351	275	176
- déjà connus CNR-MyRMA*	43 (20%)	38 (18%)	40 (11%)	19 (7%)	4 (2%)
- recensés pour la 1 ^{ère} fois	172 (80%)	173 (82%)	311 (89%)	254 (92%)	171 (97%)
Parmi les cas signalés pour la 1^{ère} fois :					
Age médian	39 (16-88)	36 (3-85)	31 (0-95)	32 (0-82)	33 (1-62)
Sexe masculin	74%	65%	60%	58%	76%
Antécédents de traitement	73%	47%	38%	37%	47%
Atteinte pulmonaire	92%	91%	90%	84%	91%
Né à l'étranger, dont:	53%	69%	82%	90%	91%
- Europe	6%	8%	15%	30%	57%
- Maghreb	16%	21%	13%	7%	5%
- Afrique Sub-saharienne	17%	25%	39%	28%	19%
- Autres	14%	14%	15%	15%	9%
Examen microscopique (+)	58%	61%	62%	48%	62%
Résistance à l'éthambutol	33%	30%	35%	53%	60%
Résistance à streptomycine	54%	58%	63%	71%	74%

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

Laboratoires ayant identifié les cas de tuberculose MDR de 2013

La **Figure 9** montre que les cas de tuberculose MDR identifiés en 2013 **sont dispersés dans de très nombreux laboratoires, 36 au total pour 93 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 36 laboratoires est compris entre 1 et 17 cas (moyenne 2.5 cas).

Les 20 laboratoires qui ont diagnostiqué au moins 50 cas de tuberculose en 2013 (total = 2422 cas, soit 59 % des cas de l'année) ont identifié 57 cas MDR (soit 61 % des cas MDR de l'année) mais 23 cas MDR ont été diagnostiqués dans les 32 laboratoires ayant diagnostiqué entre 20 et 49 cas de tuberculose et 13 cas MDR dans 118 laboratoires ayant diagnostiqué moins de 20 cas, dont 2 par les 85 laboratoires ayant diagnostiqué moins de 10 cas.





CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

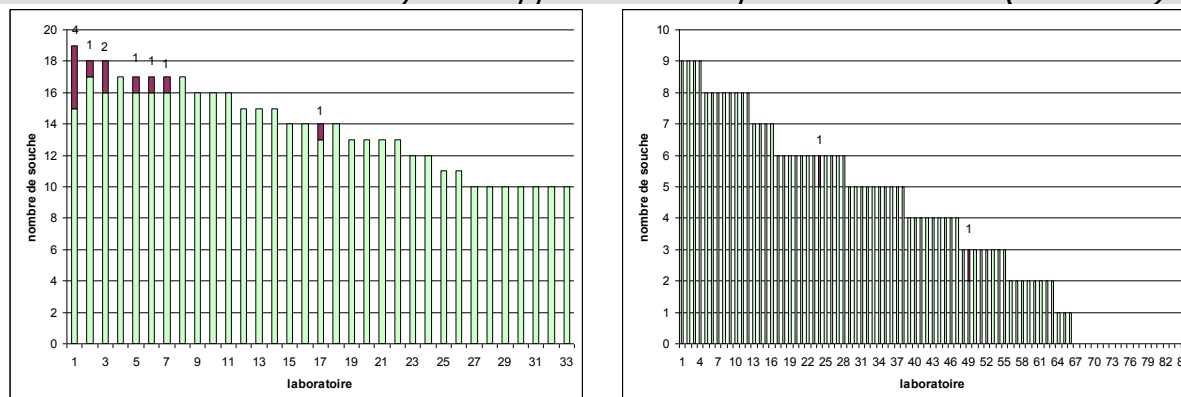


Figure 9 : Distribution des cas de tuberculose MDR diagnostiqués en 2013 selon le nombre total de cas de tuberculose diagnostiqués dans les laboratoires.

De haut en bas et de gauche à droite : les 20 laboratoires ayant diagnostiqué ≥ 50 cas (totalisent 57 cas MDR), les 32 laboratoires ayant diagnostiqué de 20 à 49 cas (totalisent 23 cas MDR), les 33 laboratoires ayant diagnostiqué de 10 à 19 cas (totalisent 11 cas MDR) et les 85 laboratoires ayant diagnostiqué < 10 cas (totalisent 2 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.

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

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

Pour cela, il est nécessaire de développer d'un système de gestion de l'information des dossiers de chaque cas de TB-MDR, robuste, simple et confidentiel adapté à l'enregistrement et au suivi des données cliniques, biologiques, thérapeutiques, incluant la tolérance aux traitements des tuberculoses MDR en France.

Ce projet de registre a reçu l'appui de la DGS et un financement partiel pour la 1^{ère} année de travail.

Le projet est développé avec la société Epiconcept sur le logiciel Voozanoo®.

L'ensemble du questionnaire en ligne est maintenant finalisé.

Certaines fonctionnalités restent à développer (cf projets section 8).

3.1.4. Surveillance de la tuberculose à *M. bovis*

Le CNR-MyRMA a effectué cette surveillance à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des laboratoires de CHU en 2012 et 2013. Ce réseau dispose également des données pour l'année 2011 mais, pour cette dernière année, les laboratoires n'ont pas contrôlé rétrospectivement que l'information « espèce » était toujours saisie dans la base de données, ce qui a pu cette année là aboutir à une sous-estimation du nombre de cas. Il faut noter de plus que quelques laboratoires du réseau n'identifient pas les mycobactéries jusqu'à l'espèce et se limitent au complexe *M. tuberculosis*. 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 hors « *M. bovis* BCG ».

En 2013, 10 cas de tuberculose à *M. bovis* ont été identifiés par les laboratoires du réseau AZAY, soit 0,9 % des 1119 souches pour lesquelles l'identification a été poursuivie jusqu'à l'espèce : 4 étaient nés en France (âges 60 - 89 ans), 5 au Maghreb (âges 15 - 54 ans), et 1 en Afrique sub-saharienne (30 ans).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

La proportion de *M.bovis* parmi l'ensemble des cas de tuberculose est stable, autour de 1%, depuis 2011 (Tableau 25). L'extrapolation de ce % à l'ensemble des cas de tuberculose recensés en France suggère que le nombre total de cas de tuberculose à *M.bovis* est de l'ordre d'une 50aine par an.

Tableau 25. Nombre et pourcentage de tuberculose à *M. bovis* en France (réseau AZAY-Mycobactéries)

Année	2011	2012	2013
Nombre de cas <i>M. bovis</i>	19	28	10
Nombre total de tuberculoses culture +*	1546	1530	1119
Pourcentage de <i>M. bovis</i>	1,2 %	1,8 %	0,9 %
Nombre de laboratoires**	35	37	27

* pour lesquelles l'identification a été poursuivie jusqu'à l'espèce ** poursuivant l'identification jusqu'à l'espèce

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

Le CNR-MyRMA continue de recueillir le nombre de cas et l'incidence des méningites tuberculeuses (MTB) chez les enfants de 5 ans et moins car cela 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. Cet indicateur est recueilli chaque année depuis 2000 et les données sont ensuite croisées avec celle de l'InVS pour approcher de l'exhaustivité

Pour cela, le CNR-MyRMA réalise une **enquête annuelle rétrospective concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants de ≤ 5 ans** à travers son réseau de laboratoires.

Le **Tableau 26** donne la distribution des cas à culture positive selon les années. Les données 2000 à 2011 ont été croisées avec celles de l'InVS. La confrontation des données 2012 et 2013 n'a pas encore été faite.

L'analyse des données 2000 à 2011 a permis de conclure à une absence d'impact à court terme de l'arrêt de la vaccination obligatoire et du passage à la vaccination ciblée sur les sujets à risque sur l'incidence de la méningite tuberculeuse chez les enfants de cinq ans et moins. Ce travail a été publiée en 2015 (*Euro Surveill* 2015;20(11):pii=21064. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21064>). Toutefois, il **semble y avoir une légère augmentation du nombre de cas** en 2012 et 2013, par rapport aux années précédentes. La modélisation réalisée par l'InVS avant l'arrêt avait suggéré une augmentation possible du nombre de cas de méningite dans les 15 ans suivants la modification de stratégie vaccinale. Les données des deux dernières années et celles de la modélisation imposent de continuer la surveillance.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 26 : Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants de 5 ans et moins de 2000 à 2013

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
2012	4
2013	3
Total	18

3.1.6. Protocole de recherche clinique « méningites communautaires en France »

Le CNR-MyRMA (Emmanuelle Cambau) 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 2014.

3.1.7. 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.

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

3.2. Surveillance de la lèpre en France

Nous avons poursuivi en 2014 la surveillance de la lèpre en France et **avons identifié 31 cas** au travers des prélèvements de patients résidant en France et reçus au CNR-MyRMA (26 nouveaux cas et 5 rechutes) : 14 à Mayotte (nouveaux cas) dont 5 originaires de l'île, 2 des Grandes Comores et 7 d'Anjouan ; 1 à la Réunion (rechute); 2 à Tahiti (rechutes), 14 en métropole (12 nouveaux cas et 2 rechutes), tous immigrants de pays ou régions où la lèpre est encore présente (Sri Lanka, Brésil, Inde, Comores, Congo, Madagascar, Mayotte, Guadeloupe, Mali) ou y ayant longtemps séjournés (Nouvelle Calédonie, Congo).

Nous avons en 2013 décidé de mener une **surveillance systématique des cas de lèpre de Mayotte** où la lèpre est encore endémique et de soumettre systématiquement à l'analyse bactériologique (microscopie, PCR, gènes de résistance) tous les cas de lèpre multibacillaire vus au dispensaire de Mamoudzou (nouveaux cas et rechutes). Les



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

biopsies sont acheminées au CNR-MyRMA via le laboratoire du CH de Mayotte (Dr Sophie Olivier). La surveillance a été poursuivie avec succès en 2014 et nous avons reçus de nombreuses biopsies qui ont permis de diagnostiquer 14 nouveaux cas dans ce département (cf ci-dessus).

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

En 2014, le CNR-MyRMA a réalisé, en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain, le génotypage (empreintes digitales génomiques) de **114 souches de *M.tuberculosis* non MDR et 110 souches MDR, soit au total 224 souches, ce qui représente une augmentation de 13 % par rapport à 2013.**

Le contexte épidémiologique des demandes de génotypage de *M.tuberculosis* complex 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, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser, en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain, le génotypage (empreintes digitales génomiques) de **114 souches de *M.tuberculosis* non MDR soit une augmentation de 40% par rapport à 2013.**

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

- suspicion 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),
- suspicion de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- suspicion de contamination de laboratoire,
- étude systématique des souches des cas de tuberculose à bacilles multirésistants, étude qui permet de participer au programme Euro-TB.

25 situations de suspicion de transmission en collectivité (61 cas) (Tableau 27) :

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas dans 17 situations et, au total, pour 37 des 61 cas. Les 17 situations comportaient chacune de 2 à 13 cas bactériologiquement reliés :

- 1 fois au sein d'une famille (2 cas liés)
- 2 fois au sein d'une école (2 cas reliés à 11 cas liés de 2012-2013 ; 2 cas liés)
- 2 fois au sein de foyers d'accueil (2 cas liés et 5 cas liés)
- 12 fois dans un contexte amical et de travail (6 fois 2 cas liés, 3 fois 3 cas liés et 1 fois 1 cas relié à 1 cas de 2013, 1 fois 1 cas relié à 2 cas de 2013 et 1 fois 1 cas relié à 3 cas de 2013).

3 situations de suspicion de transmission nosocomiale (19 cas) (Tableau 27) :

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas pour 1 des 3 situations (au total pour 2 des 19 cas) : 2 cas.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 27 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR- MyrMA en 2014, classés selon le contexte épidémiologique

Contexte	Lieu	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement	Lignée
Entreprise	Fontenay ss Bois	2	0	
Ecole	Maisons-Alf.	14 (13 de 2012-13)	13 (12 de 2012-13)	S
	La Réunion	2	2	nt
Famille	Strasbourg	2	2	Beijing
Communautaire + famille	Caen	3	3	Dehli/ CAS
Communautaire	Morlaix	4 (1 de 2013)	4 (1 de 2013)	nt
	Creteil	4	0	
	Strasbourg	3	3	Cameroon
	Strasbourg	3	3	Beijing
	Pau	3	2	Beijing
	Toulouse	3	2	nt
	Mantes-Jolie	3 (1 de 2013)	3 (1 de 2013)	bovis
	Toulouse	3 (1 de 2013)	0	
	Strasbourg	3	0	
	Nice	2	2	LAM
	Paris	2	2	nt
	Nancy	2	2	LAM
	Macon	2	2	nt
	Toulouse	2 (1 de 2013)	2 (1 de 2013)	nt
	Paris	2	0	
	Rennes	2	0	
Foyer travailleurs migrants	Drancy	5	5	Haarlem
	Monreuil	3	0	
Foyer d'hébergement	Rouen	5	2	nt
Milieu carcéral	Tarbes	2	0	
Malade→ malade	Blois	2	2	nt
Malade→ malade	Dep 82	2	0	
Technicien labo	Amiens	1 (+14 souches patients)	0	
Total		80	39	

Tendances évolutives 2006-2014

Comme le montre le **Tableau 28**, le CNR-MyRMA a identifié par génotypage chaque année de 2006 à 2014, en complément des enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT et CCLIN :

- 6 à 21 épisodes confirmés de cas groupés en collectivité par an, soit 126 épisodes en 9 ans totalisant 349 cas (2 à 13 cas par épisode). Le nombre d'enquêtes a tendance à augmenter depuis 2011 mais le nombre d'épisodes confirmés n'a pas augmenté.

- 1 à 5 épisodes confirmés de cas groupés en milieu de soins, soit 24 épisodes en 9 ans totalisant 57 cas (2 à 7 cas par épisode). Le nombre d'enquêtes et d'épisodes confirmés n'a pas augmenté ces dernières années.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 28 : 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 2014 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage)

	Collectivités et familles	Milieu de soin
2006	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
2007	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
2008	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
2009	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
2010	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
2011	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
2012	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
2013	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
2014	25 enquêtes (total : 61 cas suspects) 17 épisodes confirmés : Total 37 cas, 1 à 5 cas/épisode À noter : 1 cas lié à 10 cas de 2012 et 2 cas de 2013 ; 1 épisode de 3 cas liés à 1 cas de 2013 ; 1 épisode de 2 cas liés à 1 cas de 2013 ; 1 cas lié à 1 cas de 2013	3 enquêtes (total 19 cas suspects) 1 épisode confirmé de 2 cas liés

3.3.2. Suspensions de rechute

En 2014, le CNR-MyRMA a reçu les souches de 2 patients suspects de rechute de tuberculose pour génotypage. Dans 1 cas la rechute a été confirmée (souches identiques).

3.3.3. Suspicion de contamination de laboratoire

En 2014, le CNR-MyRMA a reçu 30 souches (dont 1 souche déjà comptabilisée ci-dessus dans le cadre des enquêtes autour d'un cas) correspondant à 13 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. Pour 9 de ces



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

13 épisodes, le génotypage a confirmé la contamination de laboratoire (souches non distinguables). Ces 9 épisodes totalisaient 22 souches, par groupes de 2 souches (7 groupes), de 3 souches (1 groupe) et 5 souches (1 groupe).

Tendances évolutives 2006-2014

Comme le montre le **Tableau 29**, le CNR-MyRMA a identifié par génotypage de 2006 à 2014 :

- 0 à 5 cas confirmés de rechute par an, soit 15 cas en 9 ans.

- 5 à 19 épisodes confirmés de contamination de laboratoire par an soit 93 épisodes en 9 ans, totalisant 249 cas (2 à 8 cas par épisodes).

Le nombre d'enquêtes et d'épisodes confirmés n'a pas augmenté depuis 2006.

Tableau 29 : 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 2014

	Suspicion de rechutes	Suspicion de contamination de laboratoire
2006	2 suspicions 0 confirmation	25 enquêtes (total : 78 souches) 19 épisodes confirmés : total 48 cas, 2 à 4 cas /épisode
2007	1 suspicion 1 confirmation	12 enquêtes (total : 28 souches) 8 épisodes confirmés : total 18 cas, 2 à 3 cas/épisode
2008	3 suspicions 3 confirmations	11 enquêtes (total : 28 souches) 8 épisodes confirmés : total 17 cas, 2 à 3 cas/épisode
2009	5 suspicions 5 confirmations	21 enquêtes (total : 59 souches) 13 épisodes confirmés : total 36 cas 2 à 6 cas/épisode
2010	0 suspicion	8 enquêtes (total : 40 souches) 5 épisodes confirmés : total 33 cas, 2 à 8 cas/épisode
2011	3 suspicions 3 confirmations	15 enquêtes (total : 40 souches) 9 épisodes confirmés : total 25 cas 2 à 5 cas/épisode
2012	8 suspicions 2 confirmations	18 enquêtes (total : 45 souches) 13 épisodes confirmés : Total 28 cas, 2 à 3 cas/épisode
2013	0 suspicion 0 confirmation	13 enquêtes (total : 34 souches) 9 épisodes confirmés : Total 22 cas, 2 à 5 cas/épisode
2014	2 suspicions 1 confirmation	13 enquêtes (total: 30 souches) 9 épisodes confirmés : Total 22 cas, 2 à 5 cas/épisode

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

Nous avons en 2014 analysé de manière systématique **110 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).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Sur le plan **phylogénique (tableau 30)**, on voit qu'entre 2006 et 2014, la proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing est passée de 19 à 47 %, augmentation qui est à mettre en relation avec l'augmentation de la part des cas MDR chez des patients nés en ex-URSS. Cependant, on note qu'en 2014, par rapport à 2013, la proportion des souches MDR Beijing a diminué de 2%, alors que celle des souches LAM a augmenté de 5%.

Sur le plan de la **comparaison des souches (empreintes digitales génomiques)**, l'analyse des résultats révèle l'existence de **15 clusters de souches pour un total de 64 des 110 souches (58%) partageant des codes MIRU 24 identiques**. La majorité de ces souches (n = 52 ; 81%) sont rattachés à la lignée Beijing (en 5 groupes de souches de respectivement 17, 16, 4, 3, et 3). Les autres clusters sont rattachés aux lignées EAI (2 souches), LAM (en 4 groupes de souches de respectivement 3, 2, 2, 2), URAL (2 souches), « nt » (en 4 groupes de souches de respectivement 2, 2, 2 et 2).

La technique **MIRU24 n'étant pas très discriminante au sein de la lignée Beijing**, le regroupement de souches en cluster au sein de cette lignée doit être analysé avec prudence avant de conclure à un lien bactériologique, et bien sûr encore davantage 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 17 souches, dont :

- 11 souches MDR (dont 5 XDR) isolées de patients originaires de Géorgie et **distinctes** par leur génotype de résistance,
- 2 couples de 2 souches XDR identiques entre elles de patients originaires de Géorgie sans qu'un lien épidémiologique ait pu être trouvé en France,
- 1 couple de 2 souches XDR de 2 patients, l'un originaire de Géorgie et l'autre de France. Ce deux cas sont inclus dans un cluster de 4 souches avec 2 autres cas de 2013. **Le cas « français » a manifestement acquis la souche d'un des 3 autres patients, probablement sur un campus hospitalier (cf § alertes)**. Pas de lien connu en France avec les 2 patients de Géorgie de 2013.

1 cluster de 16 souches, dont :

- 10 souches MDR (dont 9 XDR) isolées de patients originaires de Géorgie (n=5), Ukraine (n=2), Tchétchénie (n=1), Sénégal (n=1), Algérie (n=1) et **distinctes** par leur génotype de résistance,
- 1 couple de 2 souches XDR identiques issues de 2 patients originaires de Géorgie sans qu'un lien épidémiologique ait pu être trouvé en France,
- 1 couple de 2 souches XDR identiques issues de 2 patients l'un originaire de France, l'autre de RDC sans qu'un lien épidémiologique ait pu être mis en évidence entre eux ; ces 2 souches étaient indistingables d'une souche isolée en 2013 d'un patient originaire de Géorgie. **Le cas « français » a manifestement été acquis en France, probablement sur un campus hospitalier (cf § alerte)**. Pas de lien connu en France avec le patient de RDC de 2013,
- 1 couple de 2 souches XDR identiques issues de 2 patients originaires de **Géorgie (mari et femme)**.

1 cluster de 4 souches :

- 4 souches XDR isolées de patients originaires de Russie (n=2), Roumanie et Géorgie, **distinctes** par leur génotype de résistance.

1 cluster de 3 souches comprenant

- 3 souches MDR issues de patients originaires de Géorgie, Arménie et Sri Lanka **distinctes** par leur génotype de résistance.

1 cluster de 3 souches :

- 3 souches XDR dont 2 identiques issues de 2 patients originaires de **Russie (mari et femme)** ; la 3ème venant d'un patient originaire de Géorgie est **distincte** par son génotype de résistance.



Clusters rattachés à la lignée EAI

1 cluster de 2 souches comprenant

- 2 souches MDR identiques issues de 2 patientes originaires de France et de **Thaïlande (mère et fille)**.

Clusters rattachés à la lignée LAM

1 cluster de 3 souches comprenant

- 3 souches MDR de patients originaires de Géorgie (n=2) et Ukraine (n=1) **distinctes** par leur génotype de résistance.

1 cluster de 2 souches

- souches MDR identiques issues de 2 patients originaires de RDC. Pas de lien épidémiologique trouvé en France.

1 cluster de 2 souches

- souches MDR de 2 patients originaires l'un d'Irak et l'autre du Mali, **distinctes** par leur génotype de résistance.

1 cluster de 2 souches

- souches MDR identiques de 2 patients originaires de **France (mari et femme)**.

Clusters rattachés à la lignée URAL

1 cluster de 2 souches

- souches XDR identiques de 2 patients originaires d'Arménie (**même famille**).

Cluster de souches dites « nt »

1 cluster de 2 souches

- souches MDR identiques de 2 patients originaires de **France** pour l'un et du **Maroc** pour l'autre, possible transmission dans un **contexte de désocialisation**.

1 cluster de 2 souches

- souches MDR identiques de 2 patients originaires de Roumanie pour l'un et de Chine pour l'autre, **probable transmission en France** (à préciser par le CLAT).

1 cluster de 2 souches

- souches MDR identiques de 2 patients originaires de **Roumanie (mari et femme)**.

1 cluster de 2 souches

- souches MDR de 2 patients originaires de Centrafrique **distinctes** par leur génotype de résistance

Au total, l'analyse détaillée des 15 clusters totalisant 64 souches MDR-XDR partageant des codes MIRU 24 identiques en 2014 a permis de confirmer un **lien bactériologique et épidémiologique pour 10 grappe de 2 cas MDR de 2014 (Tableau 31)**.

D'autre part la comparaison des codes MIRU 24 des souches de 2014 avec les souches des années antérieures a permis de montrer un **lien bactériologique et épidémiologique de 2 nouveaux cas avec 7 cas anciens, totalisant 1 grappes de 9 cas** (cluster dit « Corse »)

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.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 30 : Evolution de 2006 à 2014 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignées 1, 2 et 3, et en vert lignée 4)

Lignée	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total
Groupe PGG1										
EAI	2	1	0	0	0	0		2	3	8
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	3	4	1	1	10
Beijing	11	9	15	17	19	23	38	41	52	225
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
Groupe PGG2										
Haarlem et X	5	0	2	2	2	3	2	10	9	35
LAM	5	7	3	3	4	8	16	10	19	75
URAL	4	0	2	1	0	1	2	3	4	17
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	0		1		3
S	2	2	3	1	3	3	3	2	1	20
Cameroon	2	2	3	1	3	1	3			15
Ghana (T1)	4	1	5	6	2	3	1	1	3	26
T1-T2-T3 et « nt »	19	14	18	19	12	19	21	11	18	151
Divers										
NEW-1	0	0	0	0	0	1				1
Bovis	0	0	0	0	0	1				1
Total	57	37	51	52	45	67	91	83	110	593

Le Tableau 31 résume les cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement parmi les souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2014, 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, 7 en 2013 et 11 en 2014.

Il faut remarquer que la grande majorité de ces cas reliés concernent des contaminations au sein de familles. A noter cependant de 2 cas acquis en milieu hospitalier, 1 cas acquis en foyer, 1 cas en milieu de travail et 1 grappe de 9 cas acquis en milieu professionnel et familial en Corse, sur 7 ans.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Tableau 31 : Résultats du génotypage systématique des souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2014 : cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement

	N	Cas reliés*(contexte, pays de naissance)	Lignée
2006	53	1 épisode de 2 cas (famille, Roumanie)	Non déterminé
2007	38	1 épisode de 4 cas (famille + voisins, Portugal) 1 épisode de 2 cas (famille, Cameroun)	LAM Non déterminé
2008	51	1 épisode de 3 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
2009	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Côte d'Ivoire)	nt Ghana
2010	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
2011	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
2012	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) 1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)**	Beijing nt LAM LAM nt
2013	83	1 épisode de 2 cas XDR (famille, Géorgie) 1 épisode de 1 cas (famille, Géorgie) ^{\$} 1 épisode de 1 cas (famille, Guinée) ^{\$} 1 épisode de 1 cas (foyer, Arménie) ^{\$} 1 épisode de 1 cas XDR (lieu de travail, France) ^{\$} 1 épisode de 1 cas (lieu de travail, Algérie) ^{\$} 1 épisode de 1 cas (famille, Sénégal) ^{\$}	Beijing Beijing Beijing Beijing Beijing S nt
2014	111	1 épisode de 2 cas XDR (Hôpital, Géorgie et France) 1 épisode de 2 cas XDR (Hôpital, Géorgie et France) 1 épisode de 2 cas XDR (famille, Géorgie) 1 épisode de 2 cas XDR (famille, Russie) 1 épisode de 2 cas MDR (famille, Thaïlande et France) 1 épisode de 2 cas MDR (famille, France) 1 épisode de 2 cas XDR (famille, Arménie) 1 épisode de 2 cas MDR (désocialisation, France et Maroc) 1 épisode de 2 cas MDR (lien imprécis, Roumanie et Chine) 1 épisode de 2 cas MDR (famille, Roumanie) 1 épisode de 2 cas MDR (communautaire, Corse)**	Beijing Beijing Beijing Beijing EAI LAM URAL nt nt nt nt

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

** appartiennent au même cluster de 9 cas (famille et milieu de travail clos et étroit en Corse) étalés sur 7 ans.

^{\$} cas lié avec un cas de Géorgie des années précédentes, cf trappports années précédentes pour les détails



4. Alertes

Le CNR-MyRMA a été consulté en 2014 dans le cadre des alertes suivantes

4.1. Tuberculose MDR

Episode N°1

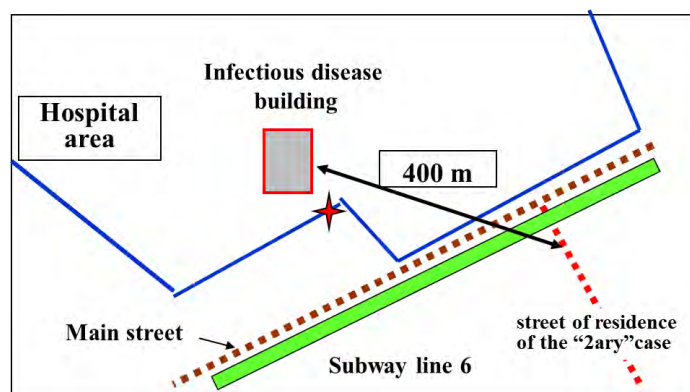
Cas 1 : patient né en France, traité par anti-TNF justifiant un traitement préventif contre la tuberculose par INH-RIF. Diagnostic de TB-XDR en juin 2014.

Le génotypage systématique des souches MDR (cf § 3.3) et l'analyse des mutations de résistance a montré que la souche était indistinguable de la souche d'un autre cas (cas 2) : patient géorgien hospitalisé de novembre 2013 à mars 2014 dans le service de maladies infectieuses de l'hôpital Pitié-Salpêtrière pour une TB-XDR très bacillifère.

L'enquête menée par l'EOH de l'hôpital n'a pas trouvé de dates communes de séjour des 2 patients à la Pitié-Salpêtrière mais a montré :

- que le cas 1 habite près de l'hôpital, fait ses courses près de l'hôpital, traverse souvent l'hôpital et utilise les toilettes publiques situées juste à côté de l'hôpital
- que le cas 2 ne respecte pas l'isolement, sort du service

L'hypothèse retenue a été un contact entre les cas 1 et 2, en dehors du service de maladies infectieuses mais dans l'hôpital ou à proximité de celui-ci (schéma ci-dessous).



Episode n°2

Cas 1 : patient né en France, résidant dans l'Essonne, ex-SDF, suivi dans le service de maladies infectieuses de l'hôpital Pitié-Salpêtrière pour VIH et VHC. Diagnostic de tuberculose XDR en décembre 2014.

Le génotypage systématique des souches MDR (cf § 3.3) et l'analyse des mutations de résistance a montré que la souche était indistinguable de celles de 3 patients géorgiens atteints de TB-XDR, pris en charge à la Pitié-Salpêtrière (cas 2), dans les hôpitaux Lariboisière et Bichat (cas 3) et à Rouen (cas 4).

L'enquête menée par l'EOH de l'hôpital Pitié-Salpêtrière a montré qu'il y avait eu des croisements possibles à la Pitié-Salpêtrière (schéma ci-dessous).

<div>Unité Unité Unité Unité Effac</div> <div>SMT</div>																	
cas	Identifiant	Dec 2012	Janv 2013	Fev 2013	marc 13	avril 13	mai 13	juin 13	juil 13	aoû 13	sept 13	oct 13	nov 13	Dec 13	Janv 2014	fev 14	mars 14
1	GU																
2	Co																



4.2. Mycobactérioses

- Poursuite de l'enquête concernant un cas d'infection à *M. marinum* survenue en 2013 chez une patiente immunodéprimée ayant eu des soins en piscine d'eau de mer (Caen, juillet 2013) :

La piscine était toujours contaminée en 2014 et les souches isolées de la piscine et de la patiente ont été montrées non indistingables en REP-PCR (ARS Normandie, CCLIN Paris Nord). Suite à ces résultats, l'eau de la piscine a été totalement remplacée par de l'eau douce de réseau. Des contrôles sont prévus en 2015.

- Un cas d'abcès sous cutanés récidivants à *M. chelonae* après injection sous-cutanée au niveau du genou pour mésothérapie (ARS Ile de France, Enquête CCLIN Paris Nord) :

L'enquête menée par le CCLIN n'a pas montré de défaillance évidente mais a émis l'hypothèse d'une contamination accidentelle par projection par de l'eau du réseau. Des recommandations sur les précautions d'antisepsie ont été faites. Aucun autre cas n'a été observé chez le praticien qui pratique la mésothérapie depuis de nombreuses années.

- Un cas d'infection sous cutanée à *M. chelonae* chez une patiente opérée d'une chirurgie du pied (ARS Ile de France) :

La recherche de mycobactérie dans l'eau de la douche utilisée par la patiente en pré- et post-opératoire a montré la présence de *M. fortuitum* mais a été négative pour *M. chelonae*. Il faut remarquer que les prélèvements d'eau avaient été faits plusieurs mois après l'intervention chirurgicale.

- Nous avons été interrogés par l'ANSM et l'InVS sur la survenue de cas d'endocardites à mycobactéries atypiques, en particulier après la déclaration de 5 cas survenus après la pose de bioprothèse cardiaque à Lyon observés entre 2010 et 2013. Nous avons participé à la prise en charge d'un 5eme cas semblable, déclaré à l'ARS 92 en 2012.



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

5.1. Information

De 2006 à 2014, le site internet <http://cnrmyctb.free.fr> a été régulièrement mis à jour pour :

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

5.2. Formation

Accueil de stagiaires et missions de formation en 2014

- **Florence Reibel**, thèse d'exercice « Génotypage des souches de *Mycobacterium leprae* en France », Faculté de Pharmacie Paris
- **Lorenzo Guglielmetti**, Master 2, UPMC, Santé Publique et Sciences Sociales - Spécialité Epidémiologie
- **Diane Martin**, Master 2, Paris 5 - Sécurité Sanitaire et Qualité des soins
- **Feriel Bouziane**, Master 2, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, « Etude de la structure et de la fonction de la protéine Erm41 dans la sensibilité de *Mycobacterium abscessus* à la clarithromycine »
- **Kim Van Eck**, Master 1, Hogeschool Arnhem en Nijmegen (HAN) University, Pays Bas. Etude de tests diagnostiques quantitatifs pour les infections à mycobactéries.
- **Stéphanie Aline**, BTS Analyses de Biologie Médicale, Lycée Pierre-Gilles de Gennes. Ecole Nationale de Chimie Physique et Biologie. Paris « Isolement et identification des mycobactéries dans le réseau d'eau du service de réanimation médicale de l'hôpital »
- **Priscilla Meyer**, BTS Bioanalyse et Contrôle. Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée, Paris « Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* et Mycobactéries non tuberculeuses dans le réseau eau en réanimation médicale »

Stages d'observation :

- **Adriana Moisoiu**, MD : stage de 10 jours dans le cadre du programme Observership de l'ESCMID. Médecin Microbiologiste au laboratoire de l'Institut de Pneumophtisiologie "Marius Nasta", de Bucarest, Roumanie.
- Délégué des laboratoires Cepheid (3 jours)
- **Irene Joshi**, Doctorat en ergonomie et psychologie du travail (1 semaine)
- Technicienne du laboratoire de mycobactériologie d'Avicenne, APHP (1 semaine)

Missions

Missions d'**Emmanuelle Cambau** sur la lèpre

- Cebu (Philippines) en février 2014 ; réseau de la surveillance de la résistance aux anti-lépreux
- Brazzaville (Congo) au siège de l'OMS Afrique en mars 2014, Technical advisory group de l'OMS
- New Delhi (Inde) au siège de l'OMS -Asie du Sud Est, Technical advisory group de l'OMS ; novembre 2014

Missions de **Laurent Raskine** au Tchad (Moundou, Ndjamena) pour l'installation et le suivi d'un laboratoire de diagnostic de la tuberculose, en janvier et en mai 2014.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Mission de **Nicolas Veziris** en Géorgie du 3 au 7 novembre 2014. Cette mission était organisée par le ministère de la santé en collaboration avec les autorités Géorgiennes. Les participants à cette mission étaient Arnaud Laurent (Esther), Emmanuelle Jouy (Ministère de la Santé), Mathilde Jachym (CM Bligny), Marie Jaspard (SMIT, Pitié-Salpêtrière), Marc-Antoine Valentin (SMIT, Pitié-Salpêtrière) et Nicolas Veziris (CNR MyrMA). L'objectif de la mission était d'évaluer l'organisation de la prise en charge des tuberculoses à bacilles MDR en Géorgie et de proposer d'éventuelles pistes d'amélioration.

La mission a évalué les structures de référence pour la prise en charge des TB-MDR tant au niveau carcéral qu'hospitalier. Des propositions d'amélioration ont été faites aux autorités Géorgiennes. Un partenariat inter-hospitalier est en train d'être mis en place à visée de formation pour les médecins Géorgiens impliqués dans la prise en charge des TB MDR.

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 Antibiotologie, Université Tours-Poitiers

DIU Antibiotologie, 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

Réunion de concertation pluridisciplinaire du groupe thérapeutique du CNR pour les infections à mycobactéries de traitement difficile

En 2014, du « **Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile** » animé par le CNR **s'est doté d'une charte** (cf annexes) pour ses réunions qui répondent désormais au label de **Réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP)**. La liste des participants présents est établie lors de chaque réunion et une bibliographie récente est mise à la disposition des participants.

Bilan des RCP 2014

Sur les 111 patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants identifiés en 2014, 51 ont fait l'objet de conseils thérapeutiques et de prise en charge des malades lors de 11 réunions.

Au total **174 dossiers ont été discutés** dans ce groupe durant les **11 réunions de 2014** car chaque patient a fait l'objet de plusieurs présentations pour modification de traitement (**Tableau 32**) :

- 54 cas de tuberculose MDR de 2014. Selon leur complexité, les dossiers de ces cas ont été examinés lors de 1 à 4 réunions.
- 6 dossiers de sujet contact de cas MDR pour discussion de prophylaxie
- 43 dossiers des années précédentes ou pour lesquels la souche n'était pas disponible en France
- 7 cas de tuberculose compliquée non MDR



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- 3 cas de mycobactérioses

En 2014, les participants réguliers aux RCP étaient :

- l'équipe du CNR-MyRMA,
- 2 praticiens du Centre Médical de Bligny (Mathilde Jachym, Damien Le Du),
- 2 pédiatres de l'hôpital trousseau (Katarina Chadelat, Guillaume Thouvenin),
- 1 pneumologue (Bertrand Dautzenberg Pitié-Salpêtrière),
- 1 membre du SAMU social de Paris (Bénédicte Rivoire)
- 3 infectiologues de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Benoît Henry, Nathalie Dournon, Marie Jaspard)

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 et s'est stabilisée en 2014 comme le montre le Tableau 32.

Tableau 32 : Activités de conseil assurées par le « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » animé par le CNR-MyRMA de 2004 à 2013

	N réunions de travail	N dossiers examinés	Types de dossiers
2006	5	11	- 2 cas XDR 2006 - 9 cas MDR 2006 (1 grossesse)
2007	5	13	- 2 cas XDR 2007 - 8 cas MDR 2007 (1 enfant 18 mois) - 3 prophylaxies contacts MDR
2008	6	44	- 22 cas MDR 2008 - 19 cas MDR 2007 (suivi) - 3 prophylaxies contacts MDR
2009	8	46	- 20 cas MDR 2009 - 18 cas MDR 2008 (suivi) - 8 prophylaxies contacts MDR
2010	9	64	- 22 cas MDR 2010 - 33 cas MDR 2008-09 (suivi) - 7 cas tuberculose compliquées non MDR - 1 prophylaxie contacts MDR - 1 mycobactériose
2011	11	70	- 27 cas MDR 2011 - 40 cas MDR 2009-10 (suivi) - 3 cas tuberculose compliquées non MDR
2012	11	148	Les 148 dossiers examinés correspondent à 83 patients : - 48 cas MDR-XDR 2012 (dossiers examinés 1 à 5 fois) - 21 cas MDR 2011 (suivi) - 4 cas MDR 2010 (suivi) - 7 prophylaxies contacts MDR - 3 cas tuberculose compliquées non MDR
2013	14	193	Les 193 dossiers examinés correspondent à 121 patients : - 47 cas MDR-XDR 2013 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 49 cas MDR 2012 - 2 cas MDR 2011 - 5 prophylaxies contacts MDR - 18 cas tuberculoses compliquées non MDR
2014	11	174	Les 174 dossiers examinés correspondent à 113 patients : - 54 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés 1 à 4 fois)



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- 27 cas MDR 2013
- 13 cas MDR 2012
- 3 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France
- 6 prophylaxies contacts MDR
- 7 cas tuberculoses compliquées non MDR
- 3 cas de mycobactérioses

Conseil pour la prise en charge des infections à mycobactéries atypiques et des cas de lèpre

L'activité de conseil en matière de mycobactérioses et de lèpre est menée en deux temps pour chaque souche de mycobactéries atypiques et pour chaque biopsie cutanée pour diagnostic de lèpre, en intervenant :

- lors de la réception de la souche, afin de s'assurer (i) qu'il s'agit d'une infection et non d'une contamination, (ii) de connaître les correspondants microbiologiste et clinicien, et de (iii) préciser l'origine de survenue de l'infection (communautaire ou liée aux soins) et l'urgence de la prise en charge thérapeutique
- lors du rendu des résultats de l'identification de la bactérie et des tests de sensibilité, afin de discuter avec les correspondants du choix du traitement antibiotique et d'éventuelles autres interventions (chirurgie, arrêt des immuno-dépresseurs, ablation de matériel infecté, etc....).

Enfin, des conseils sont régulièrement donnés concernant la pertinence et les conditions de prélèvement en cas de suspicion de lèpre et d'infection à *Mycobacterium ulcerans*, pour le diagnostic et pour le choix du traitement et de la prise en charge.

Conseil et expertises auprès des autorités sanitaires nationales et européennes

Autorités sanitaires nationales

- Laurent Raskine a participé en 2014 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 2014 (plusieurs réunions) aux travaux du Haut conseil de la santé publique (HCSP) 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).

Trois recommandations ont été publiées en décembre 2014 (voir publications sur www.hcsp.fr) :

- « **Avis relatif aux lignes directrices du diagnostic de la tuberculose à bacilles résistants ; HCSP 16 et 18 décembre 2014** »
- « **Avis relatif aux lignes directrices de la prise en charge de la tuberculose à bacilles résistants ; HCSP 16 et 18 décembre 2014** »
- **Rapport « Tuberculoses à bacilles résistants : diagnostic et prise en charge ; Lignes directrices ».**

- Emmanuelle Cambau a été interrogée par l'ANSM (octobre 2014) au sujet de déclarations antérieures (2012 et 2013) de cas d'endocardites à mycobactéries atypiques. Un groupe de travail du HCSP se mettra en place en 2015 à ce sujet.

Autorités sanitaires internationales

- Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier ont participé au travail du réseau de laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) créé sous l'égide de l'ECDC. Le contrat ECDC-réseau a été renouvelé pour 2014-2018. Ils ont assisté au 5ème workshop en septembre 2014 à Malte.
- Emmanuelle Cambau, Vincent Jarlier et Nicolas Véziris ont participé en novembre 2014 à Bâle (Suisse) à une réunion mixte EUCAST (European Union Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing), EMA (European Agency for Medicine) et ESGMYC (ESCMID study group for mycobacterial infections) pour mettre en place un cahier des charges microbiologiques destiné aux industriels adapté aux nouveaux antituberculeux avant leur mise sur le



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

marché (ex. délamanid et bédaquiline).

- Emmanuelle Cambau est co-organisatrice du "Guideline committee for diagnosis and treatment of respiratory infections due to nontuberculous mycobacteria" qui réunit 4 sociétés savantes internationales (ATS, ERS, ESCMID, IDSA) afin de proposer des recommandations consensuelles et factuelles pour le traitement des infections respiratoires à mycobactéries atypiques. Les premières réunions ont eu lieu en mai 2014 à San Diego et en septembre 2014 Munich.
- Emmanuelle Cambau a participé en tant membre du technical advisory group de l'**OMS** pour le programme de lutte mondiale contre la lèpre à deux réunions en 2014 : en mars 2014 à Brazzaville et en Novembre 2014 à New Delhi
- Emmanuelle Cambau a participé en tant membre expert à la réunion annuelle du « Réseau de surveillance de la résistance secondaire aux antiléproux » de l'**OMS** en Février 2014 à Cebu, Philippines.
- Nicolas Veziris fait partie des experts ERS/OMS pour les conseils de prise en charge des TB MDREn Europe (WHO consilium MDR-TB).



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

En 2014, sur le plan administratif, le CNR-MyRMA était adossé à l'équipe de recherche N°13 « Emergence et propagation des multi-résistances aux antibiotiques », intégrée à l'UMRS CR7- INSERM UMR 1135 « Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses » (CIMI-Paris, localisée à l'Université PM Curie (Paris 6), site Pitié-Salpêtrière.

Le responsable de l'équipe 13 est Wladimir Sougakoff, membre du CNR-MyRMA (cf liste de l'équipe)

6.1. Travaux de recherche 2014 ou en cours

6.1.1. Chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries

Méthodologie de calcul des taux de mutations de résistance aux antituberculeux in vivo chez la souris

Lors de la mise au point en 2013 du modèle in vivo chez la souris de test de fluctuation d'apparition des mutants résistants, nous avons été confrontés à l'hétérogénéité des résultats obtenus qui contraste avec ce qui peut être observé lors d'études in vitro. Afin de pouvoir résoudre ce problème, nous avons établi une collaboration avec un mathématicien, Bernard Ycart (Laboratoire Jean Kuntzmann, Université de Grenoble).

Les méthodes d'estimation des taux de mutation (ou probabilités) dans un test de fluctuations supposent généralement que le nombre final de cellules bactériennes reste constant d'une culture à une autre. Nous avons montré avec B. Ycart qu'une telle supposition conduisait à sous-estimer systématiquement le taux de mutation. Nous avons donc testé des méthodes alternatives pour estimer les taux de mutation et avons évalué leurs propriétés statistiques, par une approche théorique et par une simulation de Monte-Carlo.

Nous avons appliqué ces méthodes aux données publiées dans le travail historique de Hugo David (David HL 1970. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. Appl Microbiol 20: 810–814) ce qui nous a permis de recalculer les taux de mutation. **Ces taux étaient significativement différents de ceux calculés initialement** pour l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et la streptomycine. En particulier notre calcul a estimé un taux de mutation pour l'éthambutol de l'ordre de 10^{-9} contre 10^{-7} dans les calculs initiaux. Ces résultats sont importants puisque ce sont sur ces taux que sont basés les probabilités de sélection de mutants résistants sous traitement et la mise au point d'association d'antibiotique pour la prévenir cette sélection.

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

Base rationnelle et objectif

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'efficacité stérilisante de traitements intermittents oraux entièrement supervisés. En effet, des résultats obtenus lors d'une expérience préliminaire menée en 2012-13 avaient apporté la preuve de concept de l'efficacité stérilisante chez la souris de régimes thérapeutiques bihebdomadaires de 2 mois : rifapentine + streptomycine ou moxifloxacine.

Nous avons entrepris en 2013 et poursuivi en 2014 une très longue et volumineuse expérience pour tester plusieurs schémas thérapeutiques intermittents entièrement oraux. 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 souris**). Les bases rationnelles des choix des traitements sont citées entre parenthèses.

Expérience 1 :



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- rifapentine-moxifloxacine 2/7 (activité bactéricide en 8 semaines 2/7, Ji AAC 2008)
- rifapentine-clarithromycine 2/7 (activité stérilisante en 8 semaines 5/7, Ji AAC 2008)
- rifapentine-clarithromycine 3/7 (activité stérilisante en 8 semaines 5/7, Ji AAC 2008)
- rifapentine-clarithromycine 5/7 (témoin positif, Ji AAC 2008)
- pas de traitement (témoin négatif)

Expérience 2 :

- rifapentine-clarithromycine 2/7 (activité stérilisante en 8 semaines 5/7, Ji AAC 2008)
- rifapentine-TMC207 2/7 (activité bactéricide du TMC en 8 semaines de monothérapie 5/7, Ji AAC 2006)
- rifapentine-streptomycine 2/7 (activité bactéricide en 8 semaines 2/7, Ji AAC 2008)
- rifampicine-streptomycine 5/7 (témoin positif, Ji AAC 2009)
- 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

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.

Le nombre de rechutes durant les 28 semaines d'observation a été extrêmement bas pour tous les régimes oraux (0 à 1 pour 40 souris selon les traitements), ce qui **montre la possibilité d'obtenir dans le modèle murin d'ulcère de Buruli une activité stérilisante avec des régimes intermittents (2 ou 3 prises/semaine) de 2 mois, entièrement oraux, reposant donc sur un total de 16 à 24 prises seulement, par une association de rifapentine (rifampicine à ½ vie longue) associée à la moxifloxacine ou la clarithromycine ou la bédaquiline.** Ces résultats sont en cours de publication.

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, dapsonne 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 avons entrepris de mettre au point un modèle dans lequel (a) la



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

population bactérienne a atteint par multiplication une taille ($\sim 10^6$ afb dont $\sim 10^5$ viables) équivalente à celle chez l'homme atteint de lèpre sub-clinique (Oskam, Lepr Rev, 2007, 78 :173-185) et (b) permettant de juger du contrôle de l'infection. .

Nous avons inoculées en 2014 **230 souris immunocompétentes (Swiss) et 250 souris immunodéficientes (Nude)** par $\sim 10^5$ bacilles d'une souche de *M.leprae* virulente entretenue chez la souris Nude. Chaque population de souris a été randomisée en 4 lots au terme d'une période d'incubation de 4 mois : témoin non traités, dose unique de rifampicine, de rifapentine ou de Bédaquiline.

L'expérience se poursuivra toute l'année 2015 (cf. section 8).

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 (cf. rapports des années précédentes) que tester l'activité inhibitrice de nouvelles quinolones ou de molécules ayant la même cible (pyridones, coumarines, simocyclinones...) sur l'ADN gyrase purifiée de *M.tuberculosis* ou *M.leprae*, sauvage ou portant des mutations conférant la résistance aux fluoroquinolones « classiques » (ofloxacin), constitue une méthode fiable et très économique qui permet un screening initial (Aubry AAC 2004, Aubry AAC 2006, Aubry Biochem Biophys Res Commun 2006, Matrat, AAC 2006, Matrat AAC 2007, Matrat AAC 2008).

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. Ce projet avait permis d'obtenir en 2012 et 2013 des dérivés de la gatifloxacine (Gomez, Bioorg Med Chem. 2013). Les résultats, très positifs pour 2 composés, nous ont amené à déposer un brevet européen (n°EP 14 173 040.8) le 18 juin 2014). Grâce à un financement de la SATT Lutech pour un programme de maturation, nous allons poursuivre l'évaluation de ces composés. Pour des raisons de confidentialité, les résultats concernant ces molécules ne seront donc pas publiés pour le moment.

6.1.3. Agents antimycobactériens : mécanismes d'action et de résistance

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

La diarylquinoline (TMC207, bédaquiline) bloque la synthèse de l'ATP en inhibant l'ATP synthase, enzyme membranaire constituée de 2 domaines : catalytique (F1) et système de translocation des protons (Fo) qui contient un « rotor » mû par les protons (appelé anneau C) et dont la rotation permet la synthèse de l'ATP. La structure 3D de l'ATP synthase des mycobactéries (ou ses sous-unités) et les bases moléculaires de la liaison TMC-ATP synthase sont encore mal connues, même si les mutations conférant la résistance au TMC207 semblent concentrées dans une des sous-unités de l'ATP synthase (anneau C transmembranaire).

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, l'analyse des fractions purifiées a révélé un manque d'homogénéité des particules d'ATP synthase produites en présence de détergeant.

A partir de ces résultats, nous avons poursuivi en 2014 l'étude de la structure 3D de l'ATP synthase en nous focalisant sur les sous-unités les plus solubles (domaine catalytique non-transmembranaire) de l'enzyme en synthétisant des constructions plasmidiques optimisées destinées à exprimer les sous-unités de l'enzyme chez *E.coli*. A ce jour, nous n'avons pas encore obtenu des quantités suffisantes de protéines solubles par ce système de production hétérologue, probablement en raison du caractère très hydrophobe de l'environnement membranaire de l'ATP synthase chez *M. tuberculosis*.



Etude des mécanismes de résistance de *M. tuberculosis* au pyrazinamide : mesure de l'activité pyrazinamidase

Le tableau récapitulatif des mutations caractérisées au CNR en 2014 par séquençage du gène *pncA* chez *M. tuberculosis* confirme la très grande diversité des mutations rencontrées dans ce gène à partir de souches cliniques (cf Tableau 15). Cette diversité nous a amené à établir si la détection d'une mutation par approche PCR-séquençage dans le gène *pncA* était systématiquement corrélée à la résistance phénotypique au pyrazinamide. Les résultats préliminaires obtenus en 2013 indiquaient clairement que certaines des mutations trouvées dans le gène *pncA* ne sont pas associées à la résistance.

A partir de ces données, nous avons entrepris en 2014 le développement d'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 essayons de combiner (a) l'amplification par PCR du gène *pncA*, (b) un système d'expression in vitro de la protéine PncA et (c) la mesure quantitative à haute sensibilité de l'activité pyrazinamidase par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Un doctorant Péruvien, Mr Daniel RUEDA, a rejoint le laboratoire en septembre 2014 dans le cadre d'un programme doctoral franco-péruvien de l'Université Cayetano Heredia. Avec la participation de Mr Rueda, nous avons pu établir dans un premier temps un inventaire exhaustif des mutations *pncA* décrites dans la littérature. Nous avons ainsi recensé un total de 365 mutations décrites, parmi lesquelles 92 ont été détectées au CNR dans le cadre du diagnostic de la résistance au PZA et pour lesquelles le phénotype de résistance était disponible. De façon assez surprenante, le phénotype avait été rendu « sensible » pour 34 des 92 mutations étudiées. Dans un deuxième temps, nous avons commencé la mise au point du protocole de double amplification qui génère les fragments d'ADN permettant l'expression in vitro de la pyrazinamidase de *M. tuberculosis* à l'aide du kit RTSTM 100 Wheat Germ (5 PRIME).

A ce jour, nous avons pu amplifier les ADN à partir de souches témoins de *M. tuberculosis* H37Rv (souche sensible au PZA) et de *M. bovis* (naturellement résistante au PZA), ainsi qu'à partir de 2 souches cliniques de *M. tuberculosis*. Nous poursuivons actuellement la mise au point du protocole d'expression in vitro de la protéine PncA à partir des ADN amplifiés, ainsi que le test de l'activité pyrazinamidase par spectrométrie de masse MALDI-TOF qui devrait permettre de déterminer en 24 heures le % d'inactivation de l'activité pyrazinamidase liée à la présence d'une mutation dans *pncA*.

En combinant cette approche aux résultats phénotypiques réalisés au CNR, nous devrions être en mesure de prédire plus précisément les conséquences phénotypiques liées à la présence d'une mutation dans *pncA*, en particulier pour les mutations encore non caractérisées qui sont fréquentes dans *pncA*.

Analyse moléculaire du locus *embCAB* et du gène *embR* impliqués dans la résistance à l'éthambutol dans les souches cliniques de *M. tuberculosis*

Si les mutations au niveau du codon 306 de la protéine EmbB (Arabinosyl transférase impliquée dans la synthèse de l'arabinogalactane de la membrane externe) restent de loin les mutations les plus fréquemment observées dans les souches cliniques de *M. tuberculosis* résistantes à l'éthambutol (ETB-R), les mutations dans le locus *embCAB* et dans le gène *embR*, un activateur transcriptionnel putatif du locus *embCAB*, pourraient aussi être impliquées dans la résistance à ETB.

En 2014, nous avons réalisé une étude visant à caractériser la diversité des mutations observées dans *embCAB* et *embR* à partir d'une collection de 99 souches cliniques de *M. tuberculosis* provenant de patients vivant en France et collectées au CNR en 2010-2012, dont 71 ETB-R et 28 sensibles (ETB-S). Les résultats du séquençage complet du locus *embCAB* et du gène *embR* ont été confrontés à l'antibiogramme phénotypique, aux lignées phylogéniques et aux données de la littérature et du site PolyTB qui répertorie les mutations correspondant à des marqueurs phylogénétiques spécifiques de lignées de *M. tuberculosis* (marqueurs non impliqués dans la résistance à l'éthambutol).

L'analyse des résultats montre que parmi les 463 mutations *embCAB* et *embR* rapportées dans la littérature, dans notre étude et dans la database PolyTB, seules 8 (M306V/I/L, G406D/A/S/C and Q497R) ont été prouvées de façon non équivoque pour conférer la résistance à l'éthambutol.

Parmi les 28 souches ETB-S étudiées dans notre étude, seules 2 (7%) avaient des mutations non synonymes qui ne correspondaient pas à des marqueurs phylogénétiques phénotypiquement silencieux. Par contraste, 98% des 71 souches ETB-R avaient des mutations non synonymes dans *embCAB* qui contribuaient donc très probablement à la



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

résistance à l'éthambutol. 70% de ces mutations modifiaient les codons 306, 406 ou 497 dans le gène *embB*, alors que 13% modifiaient des codons localisés en dehors de ces 3 sites majoritaires, entre les codons 296 et 426. Par ailleurs, 15% des mutations trouvées dans les souches ETB-R étaient localisées dans la région intergénique *embC-embA*. Aucune mutation impliquée dans la résistance à l'éthambutol n'a été détectée dans les gènes *embC*, *embA* ou *embR*.

La confrontation de nos résultats avec les données de la littérature et de la database PolyTB montre que parmi l'ensemble des 463 mutations *embCAB* et *embR* rapportées seules 8 (M306V/I/L, G406D/A/S/C and Q497R) sont prouvées de façon non équivoque pour conférer la résistance à l'éthambutol.

En conclusions, le test commercial existant à ce jour pour le diagnostic génotypique de la résistance à l'éthambutol, basé exclusivement sur l'analyse du codon 306 dans *embB* a une sensibilité très insuffisante (65%). Notre étude montre que cette sensibilité pourrait être significativement augmentée (jusqu'à 80-90%) en incluant les positions G406 et Q497 de *embB*, ainsi que la zone intergénique *embC-embA*.

Ces résultats ont été soumis pour publication.

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

Les fluoroquinolones (FQ) sont des médicaments de 2^{ème} ligne clés pour le traitement de la tuberculose multirésistante. La résistance aux FQ chez *M. tuberculosis* est principalement due à des mutations dans la seule cible des FQ chez cette espèce : l'ADN gyrase (*GyrA*₂*GyrB*₂). La mesure de la sensibilité aux FQ (MSF) est effectuée par des méthodes phénotypiques, mais les tests génotypiques sont de plus en plus utilisés.

Nous avons mené en 2013 une étude visant à comparer les performances diagnostiques de la mesure de la sensibilité aux FQ par méthodes génotypiques et phénotypiques dans un modèle murin de la tuberculose. Pour ce faire, 60 souris Swiss avaient été inoculées avec *M. tuberculosis* H37Rv et traitées par lévofloxacine 200 mg/kg pendant 6 mois. Dix souris avaient été sacrifiées chaque mois et les broyats des poumons mis en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen (LJ) avec et sans ofloxacine 2 mg / L (OFX₂) (MSF « directe »). Nous avons ainsi pu constituer une banque de souches isogéniques de *M. tuberculosis* H37Rv résistantes aux FQ avec et sans mutation dans l'ADN gyrase.

Nous avons en 2014 effectué le séquençage complet de 8 souches résistantes aux FQ mais ne portant pas de mutation dans l'ADN gyrase, dans le but d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance. Ce travail est réalisé en collaboration avec le Dr T. Ioerger (Department of Computer Science, Texas A&M University, USA).

Par ailleurs, nous avons fait en 2014 le bilan de 5 années (2007-2012) de diagnostic moléculaire de la résistance aux FQ chez *M. tuberculosis* (C. Bernard, AAC, 2015). Notre étude est l'une des rares études prospectives rapportant les performances de séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB* pour le dépistage de la résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis*. Un total de 605 souches, dont 50% étaient multirésistantes, ont été analysées. Nous avons montré que (i) si la majorité (78%) des souches avec une mutation dans *gyrA* était bien résistante aux FQ, seulement 36% de celles dont le gène *gyrB* était muté étaient résistantes; (ii) 12% des souches résistantes aux FQ avaient une mutation unique dans *gyrB*; et que (iii) le séquençage de *gyrA* et de *gyrB*, tel que pratiqué maintenant au CNR-MyRMA, permet de détecter la résistance aux FQ avec une sensibilité > 93%.

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, avec les fluoroquinolones, des médicaments de 2^{ème} ligne clés pour le traitement de la tuberculose multirésistante (MDR-TB). Ils 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*) sont déjà connus pour causer la résistance croisée à ces antituberculeux. Des mutations dans le gène *tlyA*, qui code une putative méthyltransférase à ARNr, 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.

Nous avons en 2014 mesuré la sensibilité aux aminosides/peptide cyclique par méthode phénotypique (méthode des proportions / milieu de Lowenstein-Jensen) et génotypique (séquençages des gènes *rrs*, pro *eis* et *tlyA*) de 206 souches cliniques de *M. tuberculosis* MDR reçues au CNR-MyRMA en 2010-2011bv: 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.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Aucune mutation n'a été détectée dans les souches sensibles à AMK/KAN/CAP, sauf dans une (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 une mutation C14T dans *pro eis*. Parmi les 3 isolats R-AMK/KAN, les 2 R-CAP/KAN et les 3 monoR-CAP, seulement 2 (1 R-AMK/KAN et 1 R-CAP/KAN) avaient une mutation dans le promoteur de *eis* (-C14T et -G37T).

Au total, les mutations dans *rrs* étaient responsables de la résistance à AMK 21/26 fois, à CAP 21/28 fois et à KAN 22/50 fois. Parmi les 28 souches résistantes 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 souches résistantes à au moins AMK, 8/50 résistantes à au moins KAN et 7/28 résistantes à au moins CAP, montrant 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

Travail préliminaire : nous avons d'abord étudié la distribution des concentrations minimales inhibitrices de la clarithromycine et de l'amikacine sur *M. avium* complex (MAC), et avons mis en évidence une différence significative entre les espèces *M. avium* et *M. intracellulare*. Ce travail a été publié en 2014 (Renvoisé et al, J Clin Microbiol. 2014 Dec;52(12):4439-40).

Approche épidémiologique : nous avons ensuite entrepris une enquête destinée à évaluer la prévalence des résistances primaire (R-I^{aire}) et secondaire (R-II^{aire}) des mycobactéries non tuberculeuses à croissance lente (MNT-CL). Ce travail a porté sur 430 souches consécutives de *M. avium*, 341 *M. intracellulare*, 194 *M. xenopi*, et 109 *M. kansasii*, considérées comme responsables d'infection selon les critères internationaux, et reçues au CNR_MyRMA de 2006 à 2011. La notion d'un antécédent de traitement avait 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^{aire}) ou avec antécédent (R-II^{aire}) de traitement.

Nous avons finalisé les résultats de ce travail en 2014 et rédigé la publication afférente (soumise), comme suit : Pour *M. avium* complex (MAC), aucun cas de R-I^{aire} n'a été identifié, mais la prévalence de la R-II^{aire} 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^{aire} à la clarithromycine a été observée pour 7% des cas. Enfin, pour *M. kansasii*, aucune résistance à la clarithromycine, la moxifloxacine ou la rifampicine n'a été détectée.

Au terme de ce travail, nous avons pu conclure que : (a) aucun cas de R-I^{aire} n'a été détecté chez les MNT-CL, ce qui est logique puisqu'il n'y a pas de transmission interhumaine de ces bactéries. 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^{aire} 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 précédant 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 *rml* codant pour l'ARNr 23S ; en effet les mutations à ces positions sont connues pour être associées à la résistance à la clarithromycine), des souches de MAC résistantes à l'amikacine (par le séquençage de la position 1408 du gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S ; une mutation à cette position est connue pour être associée à la résistance à l'amikacine), ainsi que quelques souches sensibles « témoins » pour ces deux groupes.



6.1.4. Impact d'une prophylaxie primaire par azithromycine sur le risque d'infection à mycobactéries et à mycobactéries résistantes aux macrolides chez les patients atteints de mucoviscidose

Ce travail a été mené en collaboration avec le service de pneumologie de l'hôpital Cochin et a été publié début 2015 dans J Cyst Fibros.

L'azithromycine est connue pour réduire la fréquence des exacerbations chez les patients atteints de mucoviscidose. L'objectif de ce travail était de mesurer l'impact d'une chimioprophylaxie à base d'azithromycine sur le risque d'infection à mycobactérie chez les patients atteints de mucoviscidose.

Méthodes : De 2006 à 2010, tous les sujets adultes suivis pour mucoviscidose à l'hôpital Cochin et chez lesquels au moins un prélèvement était positif en culture à mycobactérie atypique ont été identifiés (cas). Chaque cas a été apparié individuellement pour l'âge et le sexe au plus quatre adultes atteints de mucoviscidose mais sans prélèvement positif à mycobactérie atypique (contrôles). Les données cliniques au moment du premier isolat mycobactérien ont été comparées entre cas et contrôles en analyse multivariée.

Résultats : 41 cas ont été appariés à 155 contrôles. Parmi les cas, 49% avaient au moins une mycobactérie du complexe MAC et 59% du complexe *M. abscessus* et 31 cas remplissaient les critères de l'American Thoracic Society 2007 d'infection à mycobactérie atypique (cas ATS +). Les cas et les cas ATS + étaient plus susceptibles d'avoir un faible poids et une colonisation à *Aspergillus fumigatus*. Une chimioprophylaxie par azithromycine était associée à une division par 2 du risque d'avoir une mycobactérie non tuberculeuse. Il n'y avait pas de différence de prévalence de souches de mycobactérie résistantes aux macrolides entre les cas et les contrôles.

Conclusion : ces données suggèrent que l'azithromycine pourrait constituer une prophylaxie primaire de l'infection chez les adultes atteints de mucoviscidose sans augmenter le risque de sélection de mycobactéries résistantes aux macrolides.

6.1.5. Etude génotypique des mycobactéries par « séquençage « génome entier »

Étude d'une souche de BCG-MDR

Nous avons isolé dans le cadre du CNR MyRMA une souche de *M. bovis* BCG MDR (R. à rifampicine et isoniazide) chez un enfant de 3 ans d'origine algérienne. Chez ce jeune patient vacciné à 1 mois de vie, une tuberculose ganglionnaire avait d'abord été diagnostiquée et traitée en Algérie, avant que le diagnostic soit corrigé et qu'une BCGite disséminée associée à un déficit immunitaire (par défaut de production de l'interféron gamma) soit diagnostiquée au CHU Necker-Enfants malades.

Nous avons réalisé le séquençage du génome de cette souche exceptionnelle (la multi-résistance est quasi-inconnue chez *M. bovis* BCG) (Renvoisé A, Genome Announc. 2014 Jul 10;2(4). pii: e00611-14). L'analyse de la séquence a permis : (i) de préciser la caractérisation moléculaire de la résistance de *M. bovis* BCG aux antimycobactériens, domaine encore inexploré, (ii) de montrer la complexité et la dynamique des mutations associées à la résistance aux antimycobactériens (en révélant des mutations non fixées, et/ou des mélanges de populations sauvages et de populations mutées), et (iii) de détecter des mutations dans le gène *rpoC* (codant pour la sous unité beta' de l'ARN polymérase) et ainsi d'explorer de potentielles mutations compensatoires en réponse à la résistance à la rifampicine chez *M. bovis* BCG.

Étude des souches de M.tuberculosis MDR et XDR 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 semble plus virulente 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.

Nous avons montré en 2013 (i) que les souches de la lignée Beijing sont prédominantes parmi les souches MDR isolées en France, (ii) que leur proportion continue d'augmenter, et (iii) qu'il existe des souches regroupées en



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

cluster de profil phylogénétique non différentiable sur la base du spoligotypage et du MIRU-VNTR 24 loci, alors même qu'il ne semble pas y avoir de lien épidémiologique direct entre les cas. Ces souches, qui pourraient avoir un fort potentiel de transmission dans la population européenne, sont regroupées en 2 clusters majoritaires initialement appelés cluster 2 (CL2, caractérisé par un code MLVA-MtbC15-9 de type 94-32) et cluster 5 (CL5, caractérisé par un code MLVA-MtbC15-9 de type 100-32). Ces souches proviennent essentiellement de patients originaires des pays de l'ex Union Soviétique (Géorgie, Tchétchénie, Russie, Arménie, Ukraine, Azerbaïdjan, Moldavie).

En 2014, nous avons poursuivi cette étude par une analyse poussée d'un échantillon de 19 souches MDR de *M.tuberculosis* Beijing collectées en France par le CNR MyRMA, 9 appartenant au CL2 (94-32) et les 10 au CL5 (100-32) (Figure 1). Toutes ces souches avaient été isolées de patients originaires des pays de l'ex-URSS. Nous avons également inclus dans notre étude 8 souches MDR Beijing non reliées aux clusters CL2 ou CL5 (souches non clusterisées « nc »), isolées de patients nés en Russie, en Géorgie, en Moldavie, en Inde et au Tibet.

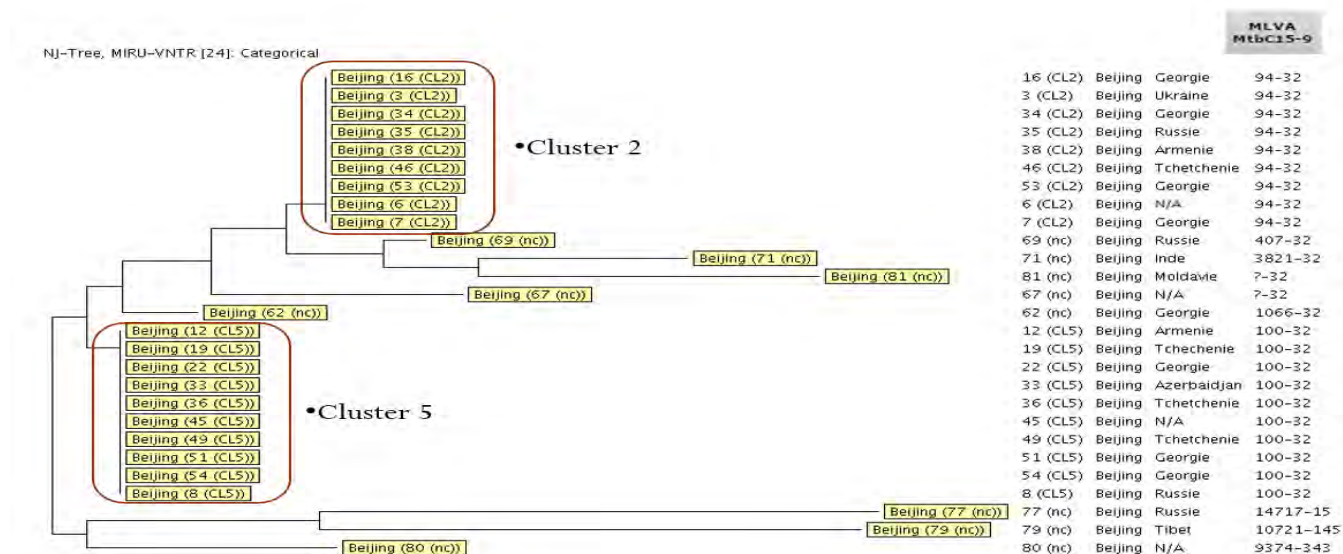


Figure 10. Dendrogramme établi pour un échantillon de 27 souches MDR Beijing à partir de l'analyse des MIRU-VNTR (24 loci).

Après avoir établi que l'approche de séquençage génomique sur plateforme Illumina MiSeq était celle qui présentait les meilleures caractéristiques pour réaliser l'analyse complète des génomes de *M.tuberculosis* (cf § ci-dessus « Comparaison des stratégies de séquençage pour *M.tuberculosis* »), nous avons entrepris la comparaison des **génomes complets des 27 souches**. Ces 27 génomes (4,6 Mbases par génome) ont été analysés et les données de séquençage ont été traitées de façon à faire ressortir les régions de différence entre les souches, plus particulièrement les SNPs (single nucleotide polymorphisms).

Les résultats de cette analyse (a) confirment l'existence de 2 larges clusters parmi les souches MDR de la famille Beijing et de plus (b) permettent de subdiviser ces clusters en branches distinctes (cf Figure 11)



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

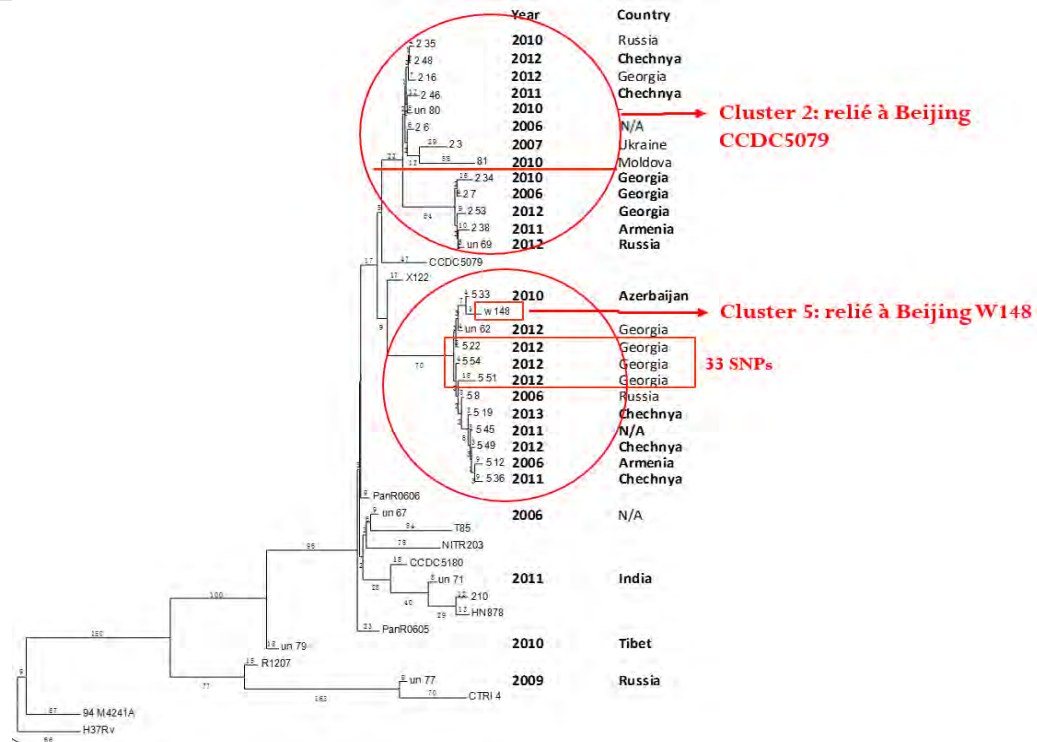


Figure 11. Dendrogramme établi à partir de l'analyse des SNPs détectés dans le génome complet d'un échantillon de 27 souches MDR Beijing isolées en France

L'analyse des génomes montre que les **souches CL5** forment un groupe très homogène (23 SNPs au maximum entre 2 souches directement reliées) et **étroitement apparenté à la souche hyper-virulente Beijing W148 originaire de Sibérie, aujourd'hui répandue dans toute la Russie**. On peut noter que les 3 souches isolées en 2012 à partir de trois patients originaires de Géorgie (encadrées en rouge sur la **figure 11**) présentent un total de 33 SNPs, ce qui exclut la transmission d'une même souche par contact direct entre ces 3 patients. L'analyse a aussi montré qu'une souche considérée sur la base du code MIRU-VNTR 24 loci comme « hors clusters CL5 et CL2 » (un62), aussi isolée en 2012 d'un patient géorgien, peut être en fait reliée au CL5 sur la base du génome entier.

L'analyse des génomes montre que les **souches CL2** peuvent être subdivisées en 2 sous-groupes **reliés à la souche Beijing CDC5079 initialement décrite en Chine**. Trois souches initialement considérées « hors clusters CL5 et CL2 » (jusqu'à 4 loci de différence en MIRU-VNTR) étaient en fait proche du cluster CL2 sur la base du génome entier (souches un80, un81 et un 69) (**figure 11**).

Par contraste, les 4 dernières souches initialement considérées « hors clusters CL5 et CL2 » un71 (Inde), un79 (Tibet), un77 (Russie) et un67 (pays inconnu) demeuraient bien séparées de ces cluster sur la base du génome entier.

Ces résultats montrent l'intérêt potentiel de l'approche par séquençage complet des génomes des souches MDR de *M.tuberculosis* Beijing en tant qu'outil de typage moléculaire à très haute résolution pour affiner dans certaines circonstances l'approche classique par MIRU-VNTR 24 loci. Elle peut permettre, en complément de l'étude des mutations de résistance (cf section 3.3.4.) d'établir que l'observation en France de souches MDR Beijing non distinguables par MIRU-VNTR 24 loci (souches des clusters CL2 et CL5) ne veut pas dire que les cas correspondant résultent de contacts directs.

L'observation de ces 2 clusters s'explique vraisemblablement par (i) un manque de pouvoir discriminant de la méthode MIRU-VNTR 24 loci pour les souches Beijing, et (ii) par une propagation active dans les pays de l'ex-URSS de souches MDR Beijing apparentées à la souche hyper-virulente W148 (CL5) et à la souche CDC5079 (CL2). Ces 2 clusters ont probablement des origines différentes (Russie et Chine respectivement), le cluster CL2 étant lui-même constitué de 2 sous-groupes de souches relativement éloignées (56 SNPs).

En conclusion, **la mise en place de l'approche génomique au CNR devrait contribuer à mieux comprendre les**



dynamiques d'émergence d'une partie des cas de tuberculose multirésistante observés en France, ainsi que les caractéristiques moléculaires des souches qui y sont associées.

Etude phylogénique des souches de *M. leprae* isolées en France

Nous avons déterminé le génotype des souches de *M. leprae* de lépromes de patients vivant en France et reçus au CNR-MyRMA entre 2009 et 2013, par amplification et séquençage de 3 SNPs aux positions 14676, 1642875 et 2935685 du génome de référence (souche TN) selon une technique décrite par Monot (Science, 2005).

Cette approche a permis de déterminer le SNP-type de la souche de 68 des 74 patients étudiés. Ce SNP-type était cohérent avec le pays de naissance du patient ou son lieu de résidence : 34 souches de sous-type 1 (Congo, Guadeloupe, Inde, Mayotte/Comores, Nouvelle-Calédonie et Sri Lanka), 17 souches de sous-type 3 (Côte d'Ivoire, La Réunion, Nouvelle-Calédonie et Tahiti), 11 souches de sous-type 4 (Afrique de l'Ouest, Brésil, Haïti, Martinique et Nouvelle-Calédonie) et 6 souches de sous-type 2 (Nouvelle-Calédonie). Ce travail a confirmé que les cas de lèpre diagnostiqués sur le territoire national ont été acquis dans des régions où la lèpre est encore endémique.

6.2 Publications et communications

Publications nationales

1. A. Renvoisé, C. Bernard. Traitement des infections à *Mycobacterium avium* complex. J Anti-Infect. 2014;16 :199-206
2. J. Robert, « Rapport d'activité 2011-12 de l'ONERBA / Annual Report 2011-12 (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). 2014. 188 pages (<http://www.onerba.org>) ».
3. J. Robert. Résistance aux antibiotiques : un enjeu de développement durable et un impératif de surveillance. HygièneS 2014 ;22 :29-40.
4. A. de Masson, E. Maillart, N. Veziris, V. Meyssonier, C. Papeix, et E. Caumes, Cavitary pulmonary disease in a patient treated with natalizumab, Presse Med. 2014 Sep;43(9):1009-12.
5. P. Mordant, B. Henry, S. Morel, J. Robert, N. Veziris, D. Le Dû, M. Frechet-Jachym, T. Similowski, É. Caumes, M. Riquet, et F. Le Pimpec-Barthes. Adjuvant surgical resection for multidrug-resistant tuberculosis: A review, *Rev Mal Respir*, vol. 31, n° 6, p. 511-524, 2014.
6. Mougari F, Cambau E. Mycobactéries et eau, Revue Francophone des Laboratoires- Février 2014 - n°459

Publications internationales

1. F. Brossier, C. Sola, G. Millot, V. Jarlier, N. Veziris, et W. Sougakoff. Comparison of a semi-automated commercial rep-PCR method with spoligotyping, 24-locus-MIRU-VNTR and IS6110-RFLP for *Mycobacterium tuberculosis* typing. *J. Clin. Microbiol.* Nov; 52(11): 4082-6. 2014.
2. T. V. Bui, V. Meyssonier, P. Y. Boelle, D. Che, D. Antoine, V. Jarlier, et J. Robert. Decrease in the incidence of culture-positive meningitis and cerebral tuberculomas in France from 1990 to 2007. *Epidemiol. Infect.*, vol. 142, n° 7, p. 1510-1516, juill. 2014.
3. I. Lerat, E. Cambau, R. Roth Dit Bettoni, J.-L. Gaillard, V. Jarlier, C. Truffot, et N. Veziris. In vivo evaluation of antibiotic activity against *Mycobacterium abscessus*. *J. Infect. Dis.*, vol. 209, n° 6, p. 905-912, mars 2014.
4. E. Macheras, J. Konjek, A.-L. Roux, J.-M. Thiberge, S. Bastian, S. C. Leão, M. Palaci, V. Sivadon-Tardy, C. Gutierrez, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes, G. E. Pfyffer, T. Bodmer, V. Jarlier, E. Cambau, S. Brisse, V. Caro, N. Rastogi, J.-L. Gaillard, B. Heym. Multilocus sequence typing scheme for the *Mycobacterium abscessus* complex. *Res. Microbiol.*, vol. 165, n° 2, p. 82-90, mars 2014.
5. A.-L. Roux, E. Catherinot, N. Soismier, B. Heym, G. Bellis, L. Lemonnier, R. Chiron, B. Fauroux, M. Le Bourgeois, A. Munck, I. Pin, I. Sermet, C. Gutierrez, N. Véziris, V. Jarlier, E. Cambau, J.-L. Herrmann, D. Guillemot, J.-L. Gaillard, for the OMA group. Comparing *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium abscessus* lung infections in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2015 Jan;14(1):63-9..



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

6. Delafont V, Mougari F, Cambau E, Joyeux M, Bouchon D, Héchard Y, Moulin L. First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environ Sci Technol*. 2014 Oct 21;48(20):11872-82.
7. Fangous MS, Mougari F, Gouriou S, Calvez E, Raskine L, Cambau E, Payan C, Héry-Arnaud G. Classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus* species, based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2014 Sep;52(9):3362-9.
8. Mougari F, Raskine L, Ferroni A, Marcon E, Sermet-Gaudelus I, Veziris N, Heym B, Gaillard JL, Nassif X, Cambau E. Clonal relationship and differentiation among *Mycobacterium abscessus* isolates as determined using the semiautomated repetitive extragenic palindromic sequence PCR-based DiversiLab system. *J Clin Microbiol*. 2014 Jun;52(6):1969-77.
9. Macheras E, Konjek J, Roux AL, Thiberge JM, Bastian S, Leão SC, Palaci M, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Richter E, Rüsche-Gerdes S, Pfyffer GE, Bodmer T, Jarlier V, Cambau E, Brisse S, Caro V, Rastogi N, Gaillard JL, Heym B. Multilocus sequence typing scheme for the *Mycobacterium abscessus* complex. *Res Microbiol*. 2014 Feb-Mar;165(2):82-90.
10. Guglielmetti L, Le Du D, Jachym M, Henry B, Martin D, Caumes E, Veziris N, Métivier N, Robert J. MDR-TB Management Group of the French National Reference Center for Mycobacteria and the Physicians of the French MDR-TB Cohort. Compassionate use of bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: interim analysis of a French cohort. *Clin Infect Dis*. 2015 Jan 15;60(2):188-94.
11. Renvoisé A, Bernard C, Veziris N, Galati E, Jarlier V, Robert J. Significant difference in drug susceptibility distribution between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol*. 2014 Dec;52(12):4439-40.
12. Ycart B, Veziris N. Unbiased estimation of mutation rates under fluctuating final counts. *PLoS One*. 2014 Jul 2;9(7):e101434.
13. Atallah D, El Kassis N, Araj G, Nasr M, Nasnas R, Veziris N, Sarkis D. Mycobacterial infection of breast prosthesis—a conservative treatment: a case report. *BMC Infect Dis*. 2014 May 5;14:238.
14. de Masson A, Maillart E, Veziris N, Meyssonier V, Papeix C, Caumes E. Cavitary pulmonary disease in a patient treated with natalizumab. *Presse Med*. 2014 Sep;43(9):1009-12.
15. Aubry A, Sougakoff W, Bodzongo P, Delcroix G, Armand S, Millot G, Jarlier V, Courcol R, Lemaître N. First evaluation of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Congo revealed misdetection of fluoroquinolone resistance by line probe assay due to a double substitution T80A-A90G in GyrA. *PLoS One*. 2014 Apr 17;9(4):e95083.
16. Godreuil S, Leban N, Padilla A, Hamel R, Luplertlop N, Chauffour A, Vittecoq M, Hoh F, Thomas F, Sougakoff W, Lionne C, Yssel H, Missé D. Aedesin: structure and antimicrobial activity against multidrug resistant bacterial strains. *PLoS One*. 2014 Aug 27;9(8):e105441.
17. Renvoisé A, Pang S, Bernard C, Brossier F, Veziris N, Capton E, Jarlier V, Sougakoff W. First whole-genome sequence of a clinical isolate of multi-drug resistant *Mycobacterium bovis* BCG. *Genome Announc*. 2014 Jul 10;2(4). pii: e00611-14
18. Bernard C, Brossier F, Fréchet-Jachym M, Morand PC, Coignard S, Aslangul E, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W, Veziris N. Concomitant multidrug-resistant pulmonary tuberculosis and susceptible tuberculous meningitis. *Emerg Infect Dis*. 2014 Mar;20(3):506-7.
19. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Mar;20(3):196-201. doi: 10.1111/1469-0691.12555.

Publications en tant que collaborateur d'études multicentriques :

20. M. L. Bastos, H. Hussain, K. Weyer, L. Garcia-Garcia, V. Leimane, C. C. Leung, M. Narita, J. M. Penã, A. Ponce-de-Leon, K. J. Seung, K. Shean, J. Sifuentes-Osornio, M. Van der Walt, T. S. Van der Werf, W. W. Yew, D. Menzies, Collaborative Group for Meta-analysis of Individual Patient Data in MDR-TB. Treatment outcomes of patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis according to drug susceptibility testing to first- and second-line drugs: an individual patient data meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.*, vol. 59, n° 10, p. 1364-1374, nov. 2014.
21. J. De Beer, C. Kodmon, M. van der Werf, J. van Ingen, D. van Soolingen, ECDC MDR-TB molecular surveillance project participants. Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011. *Euro Surveill.*, vol. 19, n° 11, 2014.
22. J. L. de Beer, C. Ködmön, J. van Ingen, P. Supply, D. van Soolingen, Global Network for Molecular



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

Surveillance of Tuberculosis 2010. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 18, n° 5, p. 594-600, mai 2014.

Communications nationales

1. L. Guglielmetti, N. Veziris, C. Bernard, F. Brossier, A. Aubry, V. Jarlier, J. Robert. De la multirésistance non compliquée vers l'ultrarésistance dans la tuberculose : 16 ans de surveillance en France. 33^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. (prix RICAI, pharmacothérapie). Communication orale.
2. L. Guglielmetti, N. Veziris, C. Bernard, D. Martin, W. Sougakoff, L. Raskine, D. Antoine, P. Tattevin, C. Andrejak, V. Jarlier, J. Robert. Registre électronique pour la prise en charge, le suivi et la surveillance des cas de tuberculose à bacilles multirésistants en France. 13^{ème} journées de Mycobactériologie de Langue Française. Dijon, 9-10 octobre 2014). Communication orale
3. L. Guglielmetti, N. Veziris, C. Bernard, D. Martin, W. Sougakoff, L. Raskine, D. Antoine, P. Tattevin, C. Andrejak, V. Jarlier, J. Robert. Registre électronique pour la prise en charge, le suivi et la surveillance des cas de tuberculose à bacilles multirésistants en France. 34^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, 27-28 novembre 2014. Communication orale
4. F. Reibel, A. Chauffour-Nevejans, F. Brossier, V. Jarlier, E. Cambau, A. Aubry. 33^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Communication orale.
5. C. Bernard, A. Aubry, V. Jarlier, N. Veziris. Émergence in vivo de la résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* : difficultés diagnostiques. 33^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Communication orale.
6. L. Guglielmetti, C. Bernard, F. Brossier, K. Chadelat, B. Dautzenberg, B. Henry, M. Jachym, L. Raskine, B. Rivoire, V. Jarlier, C. Andrejak, A. Aubry, J. Robert, N. Veziris. Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries difficiles à traiter et prise en charge des cas de tuberculose à bacilles multirésistants : bilan 2005-2013. 33^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Communication orale.
7. C. Bernard, F. Brossier, V. Meyssonier, N. Vignier, V. Jarlier, W. Sougakoff, N. Veziris, Mutation *rpoB* L533P chez *Mycobacterium tuberculosis* : fausse résistance ou réel intérêt diagnostique ? 13^{èmes} journées internationales de Mycobactériologie de langue française, Dijon. Communication orale
8. A. Chauffour-Nevejans, J. Robert, N. Veziris, A. Aubry, Vincent Jarlier. Evaluation de nouveaux traitements oraux intermittents dans un modèle murin d'infection à *Mycobacterium ulcerans*. 15^{èmes} Journées Nationales d'Infectiologie. Bordeaux. Communication affichée.
9. L. Guglielmetti, C. Bernard, N. Veziris, F. Brossier, A. Aubry, V. Jarlier, J. Robert. Facteurs associés à l'ultrarésistance (XDR) chez les cas de tuberculose à bacilles multirésistants (MDR) aux antibiotiques (1998-2013). 13^{èmes} journées internationales de Mycobactériologie de langue française, Dijon. Communication affichée.
10. F. Reibel, A. Chauffour-Nevejans, F. Brossier, V. Jarlier, E. Cambau, A. Aubry. Détermination de l'origine géographique des souches de *Mycobacterium leprae* isolées en France grâce au génotypage moléculaire. 13^{èmes} journées internationales de Mycobactériologie de langue française, Dijon. Communication affichée.
11. C. Bernard, A. Aubry, V. Jarlier, N. Veziris. Émergence in vivo de la résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* : difficultés diagnostiques. 13^{èmes} journées internationales de Mycobactériologie de langue française, Dijon. Communication affichée.
12. Renvoisé A, Brossier F, Veziris N, Galati E, Jarlier V, Bernard C. La résistance primaire existe-t-elle dans les infections à mycobactéries non tuberculeuses à croissance lente ? 15^{èmes} journées nationales d'infectiologie (JNI). 2014, Bordeaux, France, 11-13 juin 2014. Communication orale.
13. Pang S, Renvoisé A, Millot G, Capton E, Bernard C, Veziris N, Jarlier V, Sougakoff W. Épidémiologie génomique à haute résolution des souches de *Mycobacterium tuberculosis* multi-résistantes appartenant à la famille Beijing isolées en France. 34^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). 2014, Paris-la Défense, France, 27-28 novembre 2014. Communication orale.
14. C. Bernard, F. Brossier, V. Meyssonier, N. Vignier, V. Jarlier, W. Sougakoff, N. Veziris, Mutation *rpoB* L533P chez *Mycobacterium tuberculosis* : fausse résistance ou réel intérêt diagnostique ? 33^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Communication affichée
15. C Andrejak, O Peuchant, N Veziris, C Segonds, D Terru, F Hamdad, A Lagrange, V Lalande, P Bemer. Devenir et pronostic des infections pulmonaires à mycobactéries non tuberculeuses en France. 18^e Congrès de Pneumologie de Langue Française. Marseille, France 2014. Communication orale



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

16. N Veziris : Etude des facteurs déterminant in vivo la résistance aux antituberculeux. 18e Congrès de Pneumologie de Langue Française. Marseille, France 2014. Communication orale
17. A. Pham, N. Veziris, C. Bernard, V. Jarlier, W. Sougakoff, F. Brossier. Mécanismes moléculaires de la résistance aux aminosides/peptide cyclique dans les souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes isolées en France. 34^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2014. Communication orale
18. Mougari F, Amarsy R, Raskine L, Bernard C, Brossier F, Cambau E. Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance aux macrolides et aminosides chez des souches cliniques de *Mycobacterium abscessus*. 10^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie Paris 2014. Communication orale
19. Mougari F, Amarsy R, Raskine L, Bernard C, Brossier F, Cambau E. Résistance aux macrolides et aminosides chez *Mycobacterium abscessus*. Journées de Mycobactériologie de Langue Française, Dijon, 2014. Communication orale
20. Mougari F, Cordoliani F, Lhote R, Cambau E, Raskine L. Tuberculose cutanée de l'oreille à *Mycobacterium bovis*. Journées de Mycobactériologie de Langue Française, Dijon, 2014. Communication orale
21. Chauffour-Nevejans A, Beaudoin M, Jarlier V, Cambau E. Etude rétrospective de la résistance aux antilépreux pour les cas de lèpre diagnostiqués en France de 2001 à 2013. 12èmes journées internationales de Mycobactériologie de langue française, Dijon. Octobre 2014. Communication affichée

Communications internationales

1. Guglielmetti L, Raskine L, Veziris N, Bernard C, Cambau E, Group of the French NRC for Mycobacteria: Aubry A - Brossier F - Mougari F - Renvoisé A - Robert J - Sougakoff W - Jarlier V. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains detected with *rpoB* mutations: comparison between solid and quantitative liquid culture-based methods. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2014, Barcelone, Espagne, 10-13 mai 2014. Communication affichée.
2. Pang S, Renvoisé A, Millot G, Capton E, Sougakoff W. Genomic epidemiology of multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing strains family circulating in France. Congrès: 35th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology (ESM). 2014, Vienna, Austria, 29 juin-2 juillet 2014. Communication orale.
3. M. Le Goff, E. Capton, A. Pantel, V. Jarlier, C. Mayer, S. Petrella, A. Aubry. Mutations in the GyrB Subunit of *M. tuberculosis* DNA Gyrase: consequences on Resistance to Fluoroquinolones can be tricky to interpret. 45th Union World Conference on Lung Health. Communication orale.
4. A. Chauffour-Nevejans, J. Robert, N. Veziris, A. Aubry, V. Jarlier. Evaluation of new intermittent oral treatments in a murine model of Buruli ulcer. 9th Conference Louis Pasteur Emerging Infectious Disease. Paris. Communication affichée.
5. F. Reibel, A. Chauffour-Nevejans, V. Jarlier, F. Brossier, E. Cambau, A. Aubry. Phylogenetic Determination of *Mycobacterium leprae* Strains Isolated from Leprosy Patients Diagnosed in France". 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Communication affichée.
6. C Andrejak, O Peuchant, N Veziris, C Segonds, D Terru, F Hamdad, A Lagrange, V Lalande. Outcome and prognostic factors of nontuberculous mycobacteriosis in France: a cohort study of 192 patients. 23rd Annual Congress of the European Respiratory Society. Barcelona, Spain. 2014. Communication affichée
7. A Fournier, C Bernard, W Sougakoff, S Quelet, F Antoun, I Dormant, MO Dufour, V Jarlier, N Veziris. 4 years tuberculosis case contact tracing among contacts of MDR TB cases in Paris. 45th Union World Conference on Lung Health. Barcelona, Spain. 2014. Communication affichée
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*. 8th European CF Young Investigator Meeting (ECFYIM). Paris 2014. Communication orale et affichée.
9. Mougari F, Amarsy R, Raskine L, Bernard C, Brossier F, Cambau E. Phenotypic and genetic characterisation of aminoglycoside- and macrolide-resistance in clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelone 2014. Communication orale.

Conférences sur invitation nationales

Vincent Jarlier



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- Émission "Tuberculose", TV5 mars 2014
- Epidemiologic de la tuberculose, hier, aujourd'hui, demain", "symposium de l'Institut d'Immunologie et Maladies Infectieuses (IMMI), Ile de France, avril 2014.
- Tuberculose MDR-XDR, 25ème congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière, Marseille juin 2014.

Emmanuelle Cambau

- Nouveautés sur les infections à *Mycobacterium abscessus*. Congrès de la Société Française de Microbiologie (avril 2014)
- Diagnostique bactériologique de la tuberculose: moyens actuels, limites. Journée de l'action coordonnée Tuberculose Inserm-IMMI, avril 2014

Nicolas Veziris

- Détection rapide du bacille tuberculeux et de sa résistance. 15èmes Journées Nationales d'Infectiologie Bordeaux, France 2014.
- *Mycobacterium tuberculosis* sensible, MDR, XDR : Enjeux et conditions de manipulation. 10ème congrès national de la Société Française de Microbiologie. Paris, France 2014.
- Modèle animal d'immunodépression : intérêt pour la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la tuberculose. Réunion du groupe tuberculose et VIH de l'ANRS. Montpellier, France 2014.
- Apport des modèles murins pour l'évaluation de l'activité des antimycobactériens. 34^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2014.
- Résistance aux anti-infectieux chez *M. tuberculosis* : génotype vs phénotype, qui a raison ? Séminaire de recherche biomédicale, Pitié-Salpêtrière. Paris, 2014.
- Définition, situation géographique et raisons d'apparition des tuberculoses XDR. Séminaire du Centre de Liaison, d'Etude et de Formation. Paris 2014.
- Tuberculose à bacilles multirésistants. Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Raymond Poincaré. Garches, 2014.
- Résistance aux antituberculeux chez *M. tuberculosis* : génotype vs phénotype, qui a raison ? Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Necker. Paris, 2014.
- Mécanismes et épidémiologie de la multirésistance. Gericco. Pornichet, 2014.
- Tuberculose à bacilles multirésistants. Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat-Claude Bernard. Paris, 2014.
- Lutter contre la tuberculose multi-résistante : avancées récentes et défis de recherche. Réunion des Amis du Fonds Mondial. Paris, 2014.
- Tuberculose à bacilles multirésistants et ultrarésistants. Service d'accueil des urgences. Pitié-Salpêtrière, Paris 2014.
- Détection rapide du bacille tuberculeux et de sa résistance. 15èmes Journées Nationales d'Infectiologie. Bordeaux, France 2014.
- Tuberculose à bacilles multirésistants : épidémiologie actuelle et nouveautés thérapeutiques. 57^{ème} Journée de l'Hôpital Claude Bernard. Paris, 2014.
- Les erreurs à éviter pour limiter l'émergence des tuberculoses résistantes. 2^{èmes} journées du GREPI. Chantilly 2014

Laurent Raskine

- Infections à mycobactéries, « quels protocoles thérapeutiques ? ». 1eres Journées francophone de la mucoviscidose, session plénière, Montpellier, mars 2014
- Places des outils phénotypiques et génotypiques dans le diagnostic de la tuberculose résistance, 12èmes journées internationales de Mycobactériologie de langue française, Dijon. Octobre 2014

Alexandra Aubry

- Résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* : difficultés diagnostiques. 13èmes journées internationales de Mycobactériologie de langue française, Dijon

Christine Bernard



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- Tuberculoses multirésistantes et ultrarésistantes, Service de Maladies infectieuses et Tropicales, CHU Avicenne, Bobigny.

Conférences sur invitation internationales

Vincent Jarlier

- Emission « Tuberculose », Radio France Internationale 3 novembre 2014

Emmanuelle Cambau

- Leprosy and Buruli ulcer in Africa. Educational Workshop, ECCMID mai 2014, Barcelona.
- The year in Clinical Microbiology. At ECCMID mai 2014, Barcelona.
- Drug susceptibility to antileprosy agents : results of WHO sentinel laboratories », WHO Global leprosy program, Cebu (Philippines), 4-6 février 2014
- Drug susceptibility to antileprosy agents, "Technical advisory board" WHO Global leprosy program, Brazzaville (Congo) 10-12 avril 2014
- New strategies for quickly diagnosing resistance in severe infections: from phenotype to resistome. At China-France Health Forum (APHP), Beijing August 2014
- Identification of non tuberculous mycobacteria (NTM) and drug resistance testing: validated methods and proposals for standardisation; European network of reference laboratories in tuberculosis (ERLnet-TB) and ECDC meeting, Malta September 2014
- Improving chemotherapy for leprosy », "Technical advisory board" WHO Global leprosy program, New-Dehli (Inde), 5-6 novembre 2014

Nicolas Veziris

- Détection et suivi de la résistance aux anti-tuberculeux. 28ème Journées Nationales de Biologie Clinique. Hammamet, Tunisie 2014.
- Current practice in setting breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis* complex. EUCAST and ESGMYC joint meeting. Basel, Suisse 2014.



7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiènes alimentaires et environnementales

7.1. Santé animale

Nous poursuivons notre collaboration avec 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 Dr Alexis LECU et Maria-Laura BOSCHIROL

En 2014, il n'y a pas eu d'alerte de zoonose nécessitant un travail collaboratif.

Le CNR-MyRMA procède à intervalles réguliers 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). En 2014 nous n'avons pas fait d'enquêtes spécifiques mais les enquêtes conduites de 2012 à 2014 au travers du réseau AZAY-mycobactéries des CHU (cf section 3.1.4.), avaient montré que les cas à *M. bovis* représentaient de l'ordre de 1 à 2% de l'ensemble des cas de tuberculose bactériologiquement confirmés (**Tableau 25**). Ces chiffres montrent que *M.bovis* représente un danger très limité en santé humaine dans notre pays. De plus, les données étaient stables dans le temps permettent de penser que l'infection à *M. bovis* n'est pas émergente chez l'homme en France.

L'extrapolation du % ci-dessus à l'ensemble des cas de tuberculose recensés en France suggère que le nombre total de cas de tuberculose à *M.bovis* est de l'ordre d'une 50aine par an.

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.

En 2014 nous avons organisé avec les vétérinaires deux réunions sur le thème de l'infection tuberculeuse animale: l'une avec l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (Maisons Alfort), en mars 2014 et l'autre à l'occasion des Journées de mycobactériologie de langue française du groupe MYCOMED de la Société Française de Microbiologie (Dijon, octobre 2014).

7.2. Environnement

Le risque de contracter une infection à mycobactéries « 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'événements 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). 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).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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 sont régulièrement appliquées à la recherche de mycobactéries dans l'eau de réseau lors d'épidémie d'infection cutanée ou d'infection iatrogène faisant suspecter une origine hydrique.

En 2014, nous avons étudié plus particulièrement la diversité des espèces de mycobactéries présentes dans l'eau du réseau parisien. A partir des prélèvements faits par Eau de Paris pendant une année au niveau des réservoirs de distribution ou des points distaux de puisage, une recherche concomitante de mycobactéries et d'amibes a permis de montrer que les mycobactéries étaient très fréquemment présentes (87,6% des prélèvements) dans les amibes en milieu naturel. Ceci est la première observation de ce parasitisme des amibes en milieu aquatique in vivo. De plus, une fois que les amibes ont été isolées in vitro, une étude métagénomique extensive de leur contenu a montré l'extrême variété des espèces mycobactériennes présentes. Les plus fréquemment isolées étaient *M. chelonae* et *M. llatzerense*. Ces résultats, publiés en 2014 (Delafont, Environ Sci Technol), vont être complétés en 2015 par l'étude de l'interaction amibes-mycobactéries.

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.

En 2014 (cf section 4.2.) nous avons participé aux enquêtes suivantes :

- suite d'un cas d'infection à *M. marinum* survenue en 2013 chez une patiente immunodéprimée ayant reçu des soins en piscine d'eau de mer (Caen, juillet 2013). La piscine était toujours contaminée en 2014 et les souches isolées de la piscine et de la patiente ont été montrées indistingables par la technique REP-PCR (ARS Normandie, CCLIN Paris Nord).
- abcès sous cutanés récidivants à *M. chelonae* après injection sous-cutanée au niveau du genou pour mésothérapie (ARS Ile de France, Enquête CCLIN Paris Nord).
- infection sous cutanée à *M. chelonae* chez une patiente opérée d'une chirurgie du pied (ARS Ile de France)

Et nous avons procédé à l'analyse de prélèvements d'eau dans les cas suivants :

- infection cutanée à *M. abscessus* survenue à Dijon fin 2013 : cultures négatives
- infection respiratoire à *M. simiae* survenue à Brest (dans le cadre d'une rechute ou d'une suspicion de recontamination : pas d'enquête ARS) : cultures négatives pour *M. simiae*, positive pour *M. gordonae*
- infection à *M. marinum* survenue à Caen (cf ci-dessus) : culture positive à *M. marinum*
- Infection post-chirurgicale du pied à *M. chelonae* (Ile de France cf ci-dessus) : culture positive à *M. fortuitum* mais pas à *M. chelonae*

Ces prélèvements ont été faits longtemps après la survenue de l'infection et leur négativité ne permet pas d'infirmer le lien entre l'eau et le malade infecté.

7.2.3. Evaluation de risque pour des agences de santé

- Le rapport de l'HAS (audition de décembre 2013) au sujet de l'évaluation des risques liés aux pratiques de mésothérapie à visée esthétique a été publié en 2014.
- Nous avons été interrogés en 2014 par l'ANSM et l'InVS sur la survenue de cas d'endocardites à mycobactéries atypiques, suite à la déclaration de 4 cas survenus après la pose de bioprothèse cardiaque à Lyon. Nous avons participé à la prise en charge d'un 5ème cas semblable, déclaré à l'ARS 92 en 2012.

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

Nouvelle méthode de typage moléculaire complémentaire du MIRU-VNTR 24 loci

Nous avons montré en 2014 (i) que les souches de la lignée Beijing restent prédominantes parmi les souches MDR, (ii) qu'il existe des souches regroupées en clusters (CL2 et CL5) de profil phylogénétiques non différenciables sur la base du MIRU-VNTR 24 loci, mais sans lien épidémiologique direct, et (iii) que l'approche séquençage génome entier (« Whole Genome Sequencing » ou WGS) de ces souches CL2 et CL5 permet d'améliorer leur comparaison mais n'est pas parfaite non plus (cf § 6.1.5). Il faudrait pour ce type de souches mettre en place une approche complémentaire permettant d'améliorer le pouvoir discriminant du typage MIRU-VNTR 24 loci qui permettrait d'éviter le recours au WGS très consommateur de temps d'analyse. En 2014, la société Genoscreen, qui commercialise le kit MIRU-VNTR, a développé un kit complémentaire qui permet un génotypage « de 2ème ligne » des souches Beijing. Cette approche repose sur l'analyse complémentaire par MIRU-VNTR de **4 loci hypervariables** en plus du MIRU standard à 24 loci. **La mise en place en 2015 de cette approche complémentaire pour les souches Beijing** devrait améliorer significativement l'identification des cas de transmission de tuberculose MDR liée aux souches Beijing.

Développement d'un test moléculaire pour la détection de la résistance aux macrolides et aux aminosides chez des mycobactéries atypiques

Suite à nos études sur les mécanismes de résistance aux macrolides et aux aminosides chez les mycobactéries atypiques (cf rapports successifs), nous allons développer en 2015 un test moléculaire, en collaboration avec l'industriel Hain Lifesciences. La méthode utilisée sera l'hybridation inverse sur bandelettes de produits d'amplification par PCR par une trousse GenoType, comme celles commercialisées par Hain depuis plusieurs années pour la résistance aux antituberculeux, aux antiléprieux, en particulier. Pour cette nouvelle trousse (GenoType NTMDR), l'objectif est de détecter des mutations des gènes *rrl*, conférant la résistance aux macrolides, et des gènes *rrs*, conférant la résistance aux aminosides, pour les espèces *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae* et *M. abscessus*. De plus, l'identification des différentes sous espèces de *M. abscessus* sera faite par l'étude des séquevars du gène *erm41*.

Ce test devrait permettre de prédire au mieux la résistance des principales mycobactéries atypiques aux deux familles antibiotiques pour lesquelles l'efficacité a été démontrée in vivo. De plus il permettra d'identifier rapidement, par un test de biologie moléculaire et non spectrométrique comme décrit ci-dessus, les sous espèces de *M. abscessus*. En effet, nous avons montré en 2014 avec le groupe de collègues impliquées dans le suivi des enfants atteints de mucoviscidose (OMA group) que les enfants avec une souche de *M. abscessus spp. massiliense* étaient plus souvent guéris de leur infection que ceux ayant une infection à *M. abscessus spp. abscessus* (J Cyst Fibros. 2015 Jan;14(1):63-9. doi: 10.1016/j.jcf.2014.07.004. Epub 2014 Jul 30. Comparing Mycobacterium massiliense and Mycobacterium abscessus lung infections in cystic fibrosis patients. Roux AL¹, Catherinot E², Soismier N³, Heym B³, Bellis G⁴, Lemonnier L⁵, Chiron R⁶, Fauroux B⁷, Le Bourgeois M⁸, Munck A⁹, Pin I¹⁰, Sermet I⁸, Gutierrez C¹¹, Véziris N¹², Jarlier V¹², Cambau E¹³, Herrmann JL¹⁴, Guillemot D¹⁵, Gaillard JL¹⁶; OMA group.)

Méthode Epicenter®TBeXiST (Tuberculosis - extended individual susceptibility testing) pour l'étude de la sensibilité de *M. tuberculosis* aux antituberculeux de 1ère et 2ème ligne

Nous allons, en 2015, comparer en demi-routine cette nouvelle méthode (cf section 2.1.) à la méthode des proportions en LJ actuellement utilisée comme méthode de référence au CNR-MyRMA.



Quantification des mycobactéries dans les prélèvements

En 2015, nous évaluerons différentes techniques de mesure quantitative des mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses dans les prélèvements. En effet, le problème posé est de disposer de techniques permettant de quantifier les mycobactéries dans un prélèvement, sans avoir besoin d'attendre les résultats de culture, qui, du fait de la croissance lente des mycobactéries, requièrent jusqu'à 3 mois d'incubation.

Des trousse commercialisées et des tests non commercialisés basés sur les tests moléculaires courants ciblant des gènes de ménage, seront appliquées à une gamme de concentration de *M. tuberculosis* (souche référence H37Rv) et de *M. abscessus* (souche ATCC *M. abscessus abscessus*).

Mise en place en routine d'une nouvelle approche moléculaire pour la détermination par pcr-séquençage de la résistance à l'éthambutol chez *M. tuberculosis*

Le test commercial existant à ce jour pour le diagnostic génotypique de la résistance à l'éthambutol (Genotype® MTBDRsl), basé exclusivement sur l'analyse du codon 306 dans *embB*, a une sensibilité de seulement 65%. L'étude que nous avons réalisée en 2014 (cf § 6.1.3.) a démontré que l'analyse des positions G406 et Q497 de *embB* et de la zone intergénique *embC-embA* du locus *embCAB* permet d'augmenter significativement la sensibilité de la détection (jusqu'à 80-90%) en incluant. **Nous mettrons en place en 2015 l'analyse systématique par pcr-séquençage du gène *embB* et de la région intergénique *embC-embA*** pour les souches pour lesquelles nous chercherons à détecter la résistance à l'éthambutol mais n'aurons pas de mutation du codon 306 par le test Genotype® MTBDRsl.

8.2. Activités de Surveillance

Méningite tuberculeuse

Le projet de surveillance des méningites tuberculeuses à culture positive se poursuit avec la surveillance des cas à culture positive de l'année 2014 des enfants de moins de 5 ans (enquête annuelle).

Le recueil d'informations complémentaires concernant les cas signalés en 2013 est en cours.

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

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

Le projet de registre qui a reçu l'appui de la DGS et un financement partiel pour la 1^{ère} année de travail est maintenant bien avancé. Il est développé avec la société Epiconcept sur le logiciel Voozanoo®.

L'ensemble du questionnaire en ligne est finalisé

Il faudra en 2015 développer les fonctionnalités suivantes :

- Le choix des données « obligatoires »
- les contrôles à la saisie pour assurer la qualité des données,
- des rappels automatiques par courriel pour favoriser le recueil systématique des données importantes,
- le module de remplissage automatique d'ATU, de déclaration obligatoire, et de compte-rendu synthétique,
- des tableaux de bords « sur mesure » pour suivre les cas par établissement, par le groupe thérapeutique ou par les autorités sanitaires.
- La finalisation de ce projet nécessitera un financement des autorités sanitaires (DGS ? InVS ? ARS ?...).



8.3. Activités d'information, formation, conseils

Formation nationale

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

Formation internationale (stages, cours et congrès)

- Nous accueillons maintenant des collègues européens dans le cadre des bourses de partenariat ESCMID Observership. Ces bourses correspondent à des séjours dans le laboratoire de l'hôpital Lariboisière, qui est enregistré en tant que centre formateur pour les infections à mycobactéries. L'organisation est faite par l'intermédiaire de l'ESCMID, pour des séjours d'une durée de 1 semaine à 1 mois.

- Lors du congrès de l'ESCMID en Avril 2015 (ECCMID 2015, Copenhagen) une session de formation continue (Workshop organisé par E. Cambau) sera consacrée à la mycobactériologie et comprendra cette année une présentation sur les outils diagnostiques récents : PCR et amplification génique pour le diagnostic rapide de la tuberculose, biomarqueurs de l'hôte, IGRA.

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

8.4.1. *M. tuberculosis* et antituberculeux : mécanismes d'action et de résistance

Recherche de nouveaux mécanismes de résistance aux fluoroquinolones par séquençage complet du génome

Nous avons constitué in vivo chez la souris une banque de souches isogéniques à partir de *M. tuberculosis* H37Rv résistantes aux quinolones sans mutation dans l'ADN gyrase. Nous poursuivons en 2015 **le séquençage complet de souches résistantes aux quinolones** ne portant pas de mutations dans l'ADN gyrase initié en collaboration avec le Dr T. Ioerger (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.

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 (FQ) par méthodes génotypiques et phénotypiques dans un modèle murin de la tuberculose. En 2015, afin de corréler le génotype et le niveau de résistance aux FQ, les concentrations minimales inhibitrices de différentes FQ seront déterminées vis-à-vis de souches résistantes, 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 la diagnostic de la résistance et les recommandations thérapeutiques qui peuvent en découler.

Etude de l'activité résiduelle in vivo des fluoroquinolones sur des souches présentant des mutations de l'ADN gyrase

Pour les fluoroquinolones (FQ), 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, l'efficacité de certaines FQ étant même parfois conservée. Le diagnostic génotypique de la résistance aux antituberculeux remplaçant progressivement le diagnostic phénotypique, la détermination de l'impact *in vivo* de chaque mutation sur l'activité des FQ est indispensable. Nos précédents travaux, qui montrent une efficacité résiduelle de la moxifloxacin sur certains mutants résistants étant très encourageants, nous évaluerons l'intérêt de



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

la lévofloxacine dans ce même cadre car elle apporterait un avantage pharmacocinétique sur la moxifloxacine : possibilité d'augmenter les posologies tout en conservant une bonne tolérance.

Notre objectif en 2015 sera de montrer : (i) quelle est la meilleure FQ (moxifloxacine ou lévofloxacine) pour traiter les TB MDR résistantes aux FQ, et (ii) pour quelle mutation/niveau de sensibilité l'utilisation d'une FQ est-elle bénéfique ?

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

Cette approche permettra de produire des données directement utilisables en clinique. En effet, les résultats permettront de proposer une stratégie fiable pour quantifier la résistance aux FQ chez les patients tuberculeux reliant précisément génotype, phénotype de résistance et impact sur l'activité *in vivo* qui est, in fine, ce qui est attendu d'un test de sensibilité *in vitro*. Une fois que ces données seront disponibles, elles permettront l'application d'un traitement personnalisé des TB MDR et XDR dans un contexte 1) national via le groupe thérapeutique du CNR des Mycobactéries que nous animons et 2) international via notre activité d'expert européen pour le traitement des TB MDR.

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

La sous unité GyrA de l'ADN gyrase (GyrA₂GyrB₂) contient le domaine de liaison-coupeure (DLC) et le domaine a 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 du site catalytique en 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, atout majeure pour atteindre cet objectif, a permis d'obtenir une protéine fonctionnelle. Des essais de cristallisation sont en cours.

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

A la suite des résultats obtenus en 2014 (cf paragraphe 6.1.3.) nous poursuivrons l'optimisation de la synthèse des constructions plasmidiques permettant l'expression des sous-unités solubles de l'ATP synthase chez *E.coli*. En utilisant ces constructions, nous essayerons d'exprimer les différentes sous-unités solubles du domaine catalytique en quantité suffisante.

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

Nous avons entrepris en 2014 le développement d'une nouvelle approche de détection rapide de la résistance au PZA par mesure directe de l'activité pyrazinamidase à partir d'isolats cliniques (cf § 6.1.3.) Cette approche repose sur l'amplification par PCR du gène *pncA* couplée 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. Nous poursuivrons en 2015 le développement de cette approche, en nous efforçant de **caractériser précisément la perte d'activité pyrazinamidase liée aux différentes mutations du gène *pncA*** que nous identifions chaque année au CNR (cf Tableau 15).

Méthodologie de calcul des taux de mutations de résistance aux antituberculeux *in vivo*

Nous nous servirons des méthodes alternatives mises au point dans nos travaux précédents (cf § 6.1.1.) pour estimer les taux de mutation lors de nos prochains essais de sélection de mutants *in vivo*, dans le but d'approcher au mieux le risque d'échec des traitements antituberculeux.



8.4.2. Etude des souches MDR de *M.tuberculosis* par séquençage du génome entier

En 2014, nous avons étudié à l'aide d'une approche génomique à haute résolution par séquençage complet des génomes (whole genome sequencing, WGS) de 27 souches MDR de *M.tuberculosis* Beijing collectées en France par le CNR MyRMA (cf § 6.1.5). Cette étude a montré l'intérêt potentiel de cette approche comme outil de typage moléculaire pour les souches MDR non distinguables par MIRU-VNTR. A plus long terme, on peut penser que l'approche génomique devrait contribuer à mieux comprendre les dynamiques de transmission et d'émergence de la tuberculose multirésistante en France, ainsi que les caractéristiques moléculaires des souches qui y sont associées.

En 2015, nous le séquençage complet des génomes des souches MDR. La priorité sera donnée à l'évaluation de l'implantation et de l'apport de l'approche génomique dans le contexte de l'activité de routine du secteur de biologie moléculaire du CNR. Nous évaluerons (i) les aspects logistiques (délais d'obtention des données brutes du WGS et d'analyse jusqu'à la comparaison des génomes, fluidité de l'accès aux plateformes disponibles sur site (le CNR ne dispose pas à ce jour en propre de séquenceur Illumina Miseq, ni de logiciel d'analyse), (ii) les délais, (ii) l'apport de la méthode comme outil épidémiologique moléculaire en prenant en compte le taux d'erreurs liées à la méthode (en particulier les faux SNPs générés par les logiciels d'assemblage des génomes au niveau des régions répétées) et en corrélant les résultats génomiques aux données épidémiologiques, et (iii) la possibilité de mettre en place et de gérer une base de données génomique accessible à la communauté médicale et scientifique.

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

Nous avons entrepris en 2014 (cf § 6.1.1.) la mesure de l'activité des traitements à dose unique visant à prévenir le développement de la lèpre maladie chez les souris inoculées 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.

L'ensemble des manipulations sur les souris inoculées en 2014 se dérouleront tout le long de l'année 2015.

En pratique, des sacrifices auront lieu tous les 2 mois pour dénombrement des bacilles par microscopie au sein des 8 groupes de souris : (a) swiss et nude ; (b) témoins non traités, souris traitées par une dose unique de rifampicine ou de rifapentine ou de Bédaquiline.

Pour chaque groupe de souris pour lesquels il n'y aura pas eu de multiplication, les bacilles survivants en fin de traitement seront dénombrés par repiquage d'un broyat de coussinet plantaire dans le coussinet plantaire de souris Swiss « neuves ».

Les souris non sacrifiées seront conservées 12 mois après le traitement pour dénombrement des bacilles. Enfin, des souris Nude non sacrifiées permettront de surveiller l'apparition de lésions.



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 ≥ 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), **justifient 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^{ème} 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 antiléprieux (dapsone, 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*).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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

En raison du regroupement des laboratoires pour faire face aux exigences réglementaires (accréditation, textes sur le confinement de sécurité...) 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). C'est pourquoi il y a 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. Les TAG ne sont pas encore 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 trousseaux proposés doivent être méticuleusement évalués 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 (stages...).

Les techniques de **génomique** 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 (MIRU-VNTR 24 loci...) et doivent être appliquées aux cas suspects d'être liés, ou systématiquement dans certaines circonstances (ex. cas MDR-XDR).

Enfin, le **séquençage génome entier** est maintenant en place dans le laboratoire et permet l'étude globale de souches de *M.tuberculosis*, en particulier MDR.

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 **génomique** (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 génomiques, 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).



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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 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

Le laboratoire coordonnateur dispose d'un vaste secteur 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 et dispose aussi d'un secteur de sécurité de niveau 3.

Les 2 laboratoires maîtrisent toutes les techniques phénotypiques et génotypiques de mycobactériologie ce qui permet la suppléance pour les analyses d'expertise courantes et donc la continuité du service mais ils ont aussi des missions spécifiques :

(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.

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), puis par Christian Martin (Limoges) de 2011 à 2013, puis par Nadine Lemaitre (Lille) depuis 2014. 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



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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 37 en 2014. 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 260 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) (Tableau 33)

- 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) (Tableau 33)

- 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).

Tableau 33 : 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	INVS
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
Ben Radhia	Ibrahim	Technicien	1	Technicien	Tech	Pitié	INVS
Martinho	Daniel	Technicien	1	Technicien	Tech	Pitié	INVS
Charlier	Véronique	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Brisilliat	Christine	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Meyer	Karen	Technicienne	1	Technicienne	Tech	Lariboisière	InVS
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^e étage du bâtiment de la Pharmacie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, superficie totale du laboratoire 1000 m².

Les activités se déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité L3 (150 m²) 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^e 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^e étage du bâtiment CIVALE, superficie totale du laboratoire de 964 m².

Les activités du CNR se déroulent :

- dans laboratoire de sécurité biologique de niveau L3 (construction modulaire à l'extérieur du bâtiment Civale).
- dans des pièces (39 m²) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (microscopie), de leur contenu génétique (biologie moléculaire : identification, détection de mutation...) après inactivation : laboratoire de biologie moléculaire et laboratoire de microscopie fluorescente.

Principaux équipements

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

Laboratoire de sécurité L3

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

Biologie moléculaire

- extracteur d'acide nucléique de sécurité (pression négative) Roche MagNA Pure,
- extracteur d'acide nucléique automatisé QIAcube (QUIAGEN),
- 2 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Biorad iCycler, Biorad DNAEngine),
- 2 amplificateurs automatisés pour PCR « en temps réel » (MJResearch PTC-200, ABI7000),
- matériel d'hybridation manuel TwinCubator pour les bandelettes Hain,
- automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain,
- séquenceurs ADN : un monocapillaire ABI 310 (dans le laboratoire) ; un 16 capillaires ABI (sur plateforme de site



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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).

Autres équipements

- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex, Bruker),
- 1 autoclave de destruction.

Animalerie (capacité totale : 2000 à 2500 souris) :

- 4 isoteurs rigides et 8 armoires pour maintenance des animaux infectés en pression négative,
- 4 isoteurs 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),



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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

Autres équipements

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

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 » et sur 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.

Les portées initiales enclenchées en 2014 et qui feront l'objet d'une inspection COFRAC fin 2015 ou début 2016 comprennent :

- Les techniques de colorations
- L'identification génomique



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

- Lest tests IGRA
- Les hémocultures
- l'ensemble des étapes pré- et post- analytiques qui sont communes à toutes les techniques.

Participation du CNR-MyRMA aux contrôles de qualité externe supranationaux

Le CNR-MyRMA a participé à plusieurs contrôles de qualité supranationaux en 2014 :

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 par la société Instand (Dusseldorf, Allemagne). 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). Lors de chaque contrôle, une trentaine d'extraits d'ADN de *M.tuberculosis* sont analysés en MIRU-VNTR 24. Les résultats du 1er contrôle qualité réalisé en **2009-2010** ont été analysés et publiés en 2012 (*de Beer JL, et al. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):662-669*). Les résultats du 2ème contrôle qualité **réalisé en 2010-2011**, analysés récemment par le RIVM, ont été publiés en 2014 (*de Beer JL, Ködmön C, van Ingen J, Supply P, van Soolingen D; Global Network for Molecular Surveillance of Tuberculosis 2010. Int J Tuberc Lung Dis. 2014 May;18(5):594-600*). Le taux de reproductibilité obtenu par le CNR-MyRMA était très bon. **En 2014**, le CNR-MyRMA a ainsi participé au contrôle de qualité et les résultats obtenus ont été très bons.

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 2015 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 culturels, morphologiques et biochimiques), Immunochromatographie (AgMPT64®, Eurobio Biocentric), Spectrométrie de masse en MALDI-TOF.

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

Techniques de routine

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



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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 (IC₅₀) 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 34**, séparément pour l'identification, les tests de sensibilité aux antimycobactériens (mutations impliquées dans la résistance acquise) et le génoypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques).

Tableau 34 : Techniques génotypiques disponibles au CNR-MyRMA

a. Identification bactérienne

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène
Complexe <i>tuberculosis</i>	Accuprobe® Xpert® MTB/RIF GenoType®MTBDR _{plus}	
	GenoType®MTBDR _{sl} 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 _{plus} ^a MTBDR _{sl} ^p		rifampicine rifampicine, isoniazide, éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, éthambutol, fluoroquinolones
		<i>katG</i>	isoniazide
		<i>inhA</i>	isoniazide, éthionamide
		<i>pncA</i>	pyrazinamide
		<i>ethA</i>	éthionamide
		<i>ethR</i>	éthionamide
		<i>rrs</i>	amikacine, kanamycine, capréomycine, streptomycine



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

		<i>rpsL</i>	streptomycine
		<i>embB</i>	éthambutol
		<i>rrl</i>	linezolid
		<i>atpE</i>	bédaquiline
<i>M. abscessus</i>		<i>erm41 et rrl</i>	macrolides
Mycobactéries atypiques		<i>rrl</i>	macrolides
<i>M. leprae</i>	GenoType® LepraeDR		rifampicine, fluoroquinolones, dapsone
Toutes mycobactéries		<i>rpoB</i>	rifampicine
		<i>gyrA</i>	fluoroquinolones
		<i>gyrB</i>	fluoroquinolones

c. Génotypage

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène
Complexe <i>tuberculosis</i>	MIRU-VNTR 24 loci + 4 loci spécifique souches Beijing	RFLP IS6110
Mycobac atypiques	Diversilab®	Electrophorèse en champ pulsé REP-PCR

d. Séquençage haut débit

Mycobactéries concernées	Technique
Toutes	ILLUMINA HiSeq 2000)

2.2. Marqueurs épidémiologiques disponibles

- **Marqueurs de résistance** (mutations chromosomiques),
- **Marqueurs utilisés pour le génotypage** (phylogénie et empreintes digitales génomiques) : MIRU-VNTR 24 loci et les 4 loci supplémentaires spécifiques des souches de TB-MDR Beijing.
- **Séquençage génome entier**

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^{er} 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 35**). Pour chaque souche de cette collection, le phénotype de résistance a été confirmé par la méthode des proportions (méthode de référence pour les antibiogrammes de *M. tuberculosis*), quantifié par la détermination de la concentration minima inhibitrice et le mécanisme de résistance a été caractérisé génétiquement.

Tableau 35 : Souches monorésistantes aux antituberculeux de première ligne disponibles au CNR pour



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

contrôle de qualité avec leurs noms et caractéristiques génétiques et phénotypiques

Souche	de	Génotype	Phénotype de résistance en milieu de Löwenstein Jensen
<i>M.tuberculosis</i>			
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.



CNR-MyRMA rapport d'activité pour l'année 2014 (avril 2015)

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.