
Rapport annuel d'activité

2018

Centre national de référence :

**« Mycobactéries et résistance
des mycobactéries aux
antituberculeux »
(CNR-MyRMA)**

**Année d'exercice
2017**



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

Rapport commun des 2 laboratoires :

Laboratoire coordinateur

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix
Site Pitié-Salpêtrière
Responsable : Pr Vincent JARLIER

Laboratoire associé

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

Résumé analytique	4
Analytical summary	8
1. Missions et organisation du CNR-MyRMA.....	12
2. Activités d'expertise.....	13
2.1. EVOLUTIONS DES TECHNIQUES ET TRAVAUX D'ÉVALUATION	14
2.2. TECHNIQUES TRANSFERÉES VERS D'AUTRES LABORATOIRES, CQE ORGANISÉ POUR LES AUTRES LABORATOIRES NATIONAUX	15
2.3. COLLECTIONS DE SOUCHES	15
2.4. RESULTATS DES EXPERTISES	16
2.5. ACTIVITÉS DE SÉQUENÇAGE GÉNOMIQUE (WGS, NGS)	36
3. Activités de surveillance	40
3.1. DESCRIPTION DES RÉSEAUX PARTENAIRES	41
3.2. SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE AUX ANTITUBERCULEUX.....	41
3.3. SURVEILLANCE DE LA TUBERCULOSE A <i>M. BOVIS</i>	49
3.4. SURVEILLANCE DE LA MÈNINGITE TUBERCULEUSE A TRAVERS LE RÉSEAU CNR-MYRMA, TENDANCES ÉVOLUTIVES	50
3.5. SURVEILLANCE DE LA LÈPRE EN FRANCE	51
3.6. ÉTUDE GÉNOTYPIQUE DES SOUCHES DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> : DÉTECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES.....	51
4. Alertes	60
4.1. TUBERCULOSE.....	60
4.2. MYCOBACTÉRIOSES	60
5. Activités de rétro-information, formation et conseil.....	61
5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ	61
5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITÉS SANITAIRES.....	65
5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (GRAND PUBLIC ...).....	67
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	67
6.1. ACTIVITÉS DE RECHERCHE EN COURS.....	67
6.2. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	69
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, et environnementaux	72
7.1. SANTÉ ANIMALE	72
7.2. ENVIRONNEMENT.....	73
7.3. ALIMENTATION	73
8. Programme d'activité pour les 2 années suivantes.....	73
8.1. EXPERTISE.....	73
8.2. TRAVAUX DE RECHERCHE APPLIQUÉE.....	76
8.3. ÉPIDÉMIOLOGIE	78
8.4. APPUI THÉRAPEUTIQUE.....	79
8.5. CONTRIBUTION À LA DÉTECTION ET À L'INVESTIGATION DES CAS GROUPES OU DE PHÉNOMÈNES INHABITUELS	79
8.6. REGISTRE DES CAS DE TUBERCULOSE MDR	80
8.7. CONTRIBUTION AUX RÉSEAUX DE SURVEILLANCE EUROPÉENS.....	80
Annexe du § B1	82
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR.....	88
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	97

Résumé analytique

Enjeux de santé publique

Les mycobactéries comprennent plus d'une centaine d'espèces, dont :

- **les espèces pathogènes** responsables des deux grandes maladies contagieuses : la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis* complex : *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M. africanum*...) et la lèpre (*M. leprae*).

- des **espèces saprophytes** (« mycobactéries non tuberculeuses (MNT) ») dont certaines peuvent être responsables d'infections opportunistes (a) chez les immunodéprimés (ex. *M.avium* et SIDA), (b) dans les suites de manœuvres invasives (chirurgie, mésothérapie, tatouage) (ex. *M.chelonae*, *M.xenopi*, *M. chimaera*) ou (c) comme complications d'affections respiratoires chroniques (mucoviscidose, autres bronchopathies chroniques, ex. *M.abscessus*).

Tuberculose

Dans le monde (OMS) il y a ~9 millions de cas soit une incidence globale de ~100/10⁵ habitants. En France, après une régression importante durant les dernières décennies, il reste ~6000 cas/an (incidence ~9/10⁵) sur la base des cas déclarés et de la sous déclaration, qui concernent surtout 2 groupes de population : les sujets âgés nés en France (surtout > 60 ans) et les sujets jeunes nés à l'étranger (surtout 20-44 ans).

La résistance aux anti-tuberculeux joue un rôle essentiel dans la prise en charge de la maladie car elle expose au risque d'échec du traitement standard (isoniazide [INH], rifampicine [RIF], éthambutol, pyrazinamide 2 mois puis INH-RIF 4 mois). La résistance à INH (données CNR-MyRMA) a doublé ces dernières années ; 4 à 8% chez les nouveaux cas (résistance 1^{aire}) et 16% à 32% chez les cas avec antécédent de traitement (résistance 2^{aire}).

La résistance limite beaucoup les possibilités thérapeutiques en cas d'accumulation de résistance à INH+RIF (« multirésistance, MDR ») et encore plus en cas de résistance supplémentaire aux fluoroquinolones et aux aminosides (ex. amikacine) (« ultrarésistance, XDR »). Dans ces cas, le succès thérapeutique est très compromis et les taux de mortalité sont élevés.

Dans le monde (données OMS), le nombre de cas MDR est estimé à ~500.000 (3% des nouveaux cas et 20% des cas déjà traités), et le nombre de cas XDR est estimé à ~50.000.

En France (données CNR-MyRMA), les cas MDR ont doublé ces dernières années (~100 cas/an depuis 2012, dont ~20 cas XDR) et sont diagnostiqués dans une quarantaine de laboratoires de taille variées et dispersés sur le territoire. Ces laboratoires ont en général besoin de recourir à un centre d'expertise pour des investigations complémentaires (ex. tests de sensibilité aux antituberculeux de 2^{ème} ligne)

L'évolution de la résistance aux antituberculeux justifie une surveillance à partir des laboratoires. L'organisation de réseaux de laboratoires qui ont une activité de mycobactériologie (cf. plus loin) constitue une solution efficace pour cette surveillance.

Lèpre

Le nombre de nouveaux cas de lèpre est évalué à ~210 000 cas/an dans le monde (OMS). En France, il y a ~100 nouveaux cas/an détectés dans les territoires ultramarins, dont la moitié (incidence ~15/10⁵ habitants) dans l'île de Mayotte (Océan indien). Des cas importés sont aussi régulièrement diagnostiqués en métropole chez des migrants venant de pays à forte prévalence (Indes, Madagascar, Comores...). *M.leprae* n'est pas cultivable in vitro mais des techniques moléculaires mises en place au CNR-MyRMA permettent de l'identifier dans les biopsies cutanées et déceler les mutations responsables de résistance acquise aux antilépreux.

Infections à mycobactéries non tuberculeuses

Les mycobactérioses, dont le nombre est estimé entre 500-1000 cas par an en France (pas de système de déclaration), 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 (ex. clarithromycine et *M.avium*).

Faits majeurs à prendre en compte

Organisation de la mycobactériologie en France

En raison du regroupement des laboratoires pour faire face aux exigences réglementaires (accréditation, sécurité...), le nombre de laboratoires ayant des activités de mycobactériologie a diminué en France de 350 à 220 ces 20 dernières années (187 cette année).

Les laboratoires de CHU, qui gardent des compétences en mycobactériologie, ont constitué il y a plusieurs années un **réseau universitaire (« Azay-mycobactéries », 39 CHU)** permettant de mener une surveillance fine basée sur des méthodologies standardisées. Ces laboratoires diagnostiquent **~1/3 des cas de tuberculose à culture + (C+) de France**.

Les autres laboratoires (Centres Hospitaliers Généraux, laboratoires privés...), ayant moins de compétences et de moyens dans le domaine, mais qui **diagnostiquent les 2 autres tiers de cas C+**, participent activement **au réseau du CNR-MyRMA**, permettant une surveillance basée sur des méthodologies simplifiées, adaptées au temps limité que ces laboratoires peuvent y consacrer.

Développements des techniques de mycobactériologie

Les tests **diagnostics d'amplification génique commercialisés** sont maintenant accessibles à des laboratoires non spécialisés en mycobactériologie. Il est recommandé (HCSP 2014) de les appliquer à tout prélèvement

respiratoire à examen microscopique + (cas les plus contagieux) pour détecter *M.tuberculosis* et la résistance à la rifampicine (marqueur de la multirésistance).

Malgré la diminution du nombre de laboratoires qui ont des activités de mycobactériologie (cf supra), **les diagnostics des cas de tuberculose et de mycobactérioses sont encore dispersés entre de nombreux laboratoires** ayant une expertise limitée dans le domaine (médiane ~10 cas/an seulement). C'est pourquoi il est important de mettre à la disposition de ces derniers laboratoires expertise et conseils techniques.

Les mécanismes moléculaires de la résistance aux anti-tuberculeux étant des mutations chromosomiques (pas de plasmide ni de transposon de résistance), les **trousses pour détection génomique de ces mutations font l'objet d'importants développements industriels**. Ces trousses doivent être méticuleusement évaluées en terme de sensibilité et spécificité, mais aussi de valeurs prédictives en tenant compte de la prévalence de la résistance dans des situations épidémiologiques bien définies (nouveaux cas, rechutes, pays de naissance...). Les résultats des tests génomiques étant souvent d'interprétation délicate, il est important de développer des actions de formations (stages).

Le génotypage des mycobactéries a pour objectifs principaux (a) de comparer les souches dans le cadre d'enquêtes (suspensions de liens entre des cas) et (b) d'étudier la phylogénie au sein des espèces mycobactériennes, en particulier *M. tuberculosis*. La technique de référence de routine pour *M. tuberculosis* (MIRU-VNTR 24 loci...) est performante et est utilement appliquée aux cas suspects d'être liés, et systématiquement aux cas MDR-XDR. En revanche, des recherches doivent être menées pour les mycobactéries non tuberculeuses, probablement espèce par espèce, car les connaissances sont réduites dans ce domaine.

Le **séquençage génome entier (WGS)**, maintenant en place dans les deux laboratoires du CNR-MyRMA, permet une étude approfondie des souches de *M. tuberculosis*, en particulier MDR, et de certaines MNT.

Les **tests immunologiques in vitro** (IGRA) permettant de faire le diagnostic d'infection par le bacille tuberculeux, sont de plus en plus utilisés à la place des tests cutanés à la tuberculine. Ces tests doivent progresser afin de pouvoir différencier infections récentes et anciennes, et de prédire l'évolution de l'infection vers la maladie.

Résumé des résultats de l'année 2017 dans le cadre des missions du CNR

Améliorations techniques et évaluation des trousses

- Mise au point d'un nouvel workflow pour le séquençage du génome entier de *M. tuberculosis* (Pitié-Salpêtrière) et des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) (Lariboisière)

- Introduction de tests génotypiques pour détecter la résistance au linézolide et à la bédaquiline chez les souches MDR de *M. tuberculosis* et amélioration de la détection de la résistance à l'éthambutol par ajout de la région promotrice (*embC-embA*)

- Amélioration de l'identification des MNT en particulier des souches du complexe *M. avium*, afin de distinguer *M. chimaera* responsable d'une épidémie mondiale d'infections cardio-vasculaires post-CEC

- Evaluation de la trousse quantiféron Gold plus vs Gold pour les sujets contacts lors d'enquête autour de cas

Contrôles externes de qualité

Contrôles de qualité externe (CQE) européens (ECDC-ERLTBnet, Instand) faits dans les deux laboratoires: (a) prélèvements et souches pour examen microscopique, culture, identification, tests de sensibilité, amplification génique et détection moléculaire de la résistance, (b) suspensions d'ADN de *M. tuberculosis* pour génotypage MIRU-VNTR. Tous les résultats étaient conformes.

Nombre de souches et prélèvements reçus

Nous avons reçus au CNR-MyRMA en 2017 un peu plus de 1000 souches (55% *M.tuberculosis*, 45% MNT) : 858 pour identification, 556 pour tests phénotypiques de résistance, 529 pour tests génotypiques de résistance (+13% vs. 2016), 227 pour génotypage et 111 pour diagnostic de lèpre.

Le CNR-MyRMA a effectué plus de 2000 analyses génotypiques (gènes étudiés pour identification ou recherche de mutations de résistance), plus de 4000 tests phénotypiques (antibiotiques testés) et 68 séquençages complets de génomes.(WGS).

Identification des espèces sur les souches reçues

M. tuberculosis complex : 92% *M. tuberculosis*, 6% *M.africanum*, 1% *M.bovis*

MNT: 18% *M. avium*, 11% *M. intracellulare*, 16% *M. chimaera*, 15% *M. abscessus*, 8% *M. xenopi*.

Résistance phénotypique acquise des souches

M. tuberculosis complex

- 68% de résistance à au moins un antituberculeux 1ère ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine), dont 28% multirésistantes (MDR, résistantes à l'isoniazide et la rifampicine). Ce n'est pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour expertise que l'on peut établir des statistiques représentatives de résistance en France car ces souches sont en général adressées précisément pour suspicion de résistance. En revanche, l'analyse des souches reçues permet une étude précise des mécanismes de résistance prévalents en France.

- Le CNR reçoit la totalité des souches MDR-XDR identifiées en France, nombre qui a doublé depuis 7 ans (70 à 100 cas/an) : 82 cas MDR dont 10 cas XDR en 2017.

- Résistance aux principaux antituberculeux de 2ème ligne parmi les souches MDR : 23% à au moins un des 3 aminosides (kanamycine, amikacine, capréomycine) et 18% aux fluoroquinolones.

Mycobactéries non tuberculeuses

La résistance acquise n'est trouvée que chez les souches de patients déjà traités (résistance 2aire par sélection de mutants résistants sous traitement) : (a) clarithromycine : 16% chez *M. avium*-intracellulaire complexe, 6% *M. abscessus*; (b) amikacine 8% chez *M. abscessus* ; (c) 0% à la rifampicine chez *M. kansasii*.

Mutations impliquées dans la résistance acquise

M. tuberculosis complex

- . rifampicine : gène *rpoB* chez toutes les souches résistantes (dont 2/3 mutation S531L)
- . isoniazide : ¾ de mutations S315T dans *katG* (résistance de haut niveau), ¼ région régulatrice du gène *inhA* (dont la moitié des souches ayant cette mutation isolée ce qui génère une résistance de bas niveau)
- . grande diversité des mutations dans le gène *pncA* pour le pyrazinamide
- . position 306 du gène *emB* pour l'éthambutol
- . gène *gyrA*, plus fréquent à la position 94,
- . grande diversité de mutations dans le gène *ethA* pour l'éthionamide (
- . gène *rrs* pour les aminosides.

Mycobactéries non tuberculeuses

Mutations dans le gène *rrl* (ARN 23S) pour la clarithromycine et dans le gène *rrs* (ARNr16S) pour l'amikacine.

M. leprae

Aucun cas de résistance aux antiléproux parmi les 27 cas de lèpre bactériologiquement confirmés en 2017.

WGS

38 souches de *M. tuberculosis* et 30 souches de MNT (20 *M. chimaera* et 10 *M. chelonae*) ont été séquençées pour analyse phylogénique ou comparaison en cas d'épidémies.

Surveillance de la résistance 1aire et 2aire à travers le réseau Azay-mycobactérie

- 1674 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016 par 39 CHU (recueil mené en 2017)
- caractéristiques principales des cas : 6,7 % antécédents de traitement ; 5,7 % VIH+ ; 67 % nés à l'étranger, en forte augmentation depuis les années 1990 (35%)
- taux de résistance 1aire (pas d'antécédent de traitement) : 14,5 % à au moins un des 4 antituberculeux de 1ère ligne ; 9,6 % chez les patients nés en France mais 16,6 % chez ceux nés à l'étranger (p<0,02), 6,6 % à l'isoniazide (augmentation régulière significative depuis 1995) ; 1,7 % à la rifampicine
- taux de multirésistance 1aire : 1,9% (double de celui de 2009 et 2010)
- taux de résistance 2aire (antécédents de traitement) en augmentation depuis 20 ans : 18,9% à l'isoniazide (16,7 % en 1995), 13,5 % à la rifampicine (7,9% en 1995)
- La presque totalité des cas de multirésistance 1aire et 2aire concernaient des patients nés à l'étranger
- taux global de multirésistance dans les CHU : 3,7 % (23 cas)
- la quasi-totalité des cas résistants à la rifampicine étaient aussi résistants à l'isoniazide ce qui en fait un bon marqueur de multirésistance.

Surveillance à visée exhaustive de la tuberculose MDR à travers le réseau CNR-MyRMA

- 4221 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016 à travers 187 laboratoires du réseau (recueil mené en 2017), dont plus de la moitié concentrés dans une 20aine de laboratoires (CHU, 2 gros CHG, 2 gros laboratoires privés et 1 laboratoire de sanatorium Ile de France),
- 70 cas MDR en 2016, soit 1,7 % (IC95 : 1,3-2,1%) du total des cas,
- % de cas MDR inférieur à celui calculé sur les cas diagnostiqués par les CHU du réseau Azay-Mycobactéries (3,7%), en raison du caractère spécialisé des services, ce qui montre l'intérêt de travailler avec deux réseaux complémentaires,
- le % de cas MDR a triplé depuis le début de la surveillance en 1992 (0,4-0,7% en 1993-1998),
- la moitié des cas MDR est diagnostiquée en Ile-de-France
- caractéristiques des cas MDR : 62% d'hommes, 78% nés à l'étranger (dont 1/2 en Europe de l'Est), âge médian 34 ans, 7% VIH+, 81 % forme pulmonaire, 49% sans antécédents de traitement
- les caractéristiques des cas MDR se sont beaucoup modifiées depuis 1992 : diminution de 73% à 35% d'antécédents de traitement ; augmentation de 51% à 86% des patients nés à l'étranger (essentiellement Europe de l'est et ex-URSS).

Surveillance de formes particulières de tuberculose

- Tuberculose à *M. bovis* (à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des CHU) : 2,6% des cas de tuberculose ce qui permet d'extrapoler à 60-70 le nombre de cas à *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).

Contribution aux réseaux de surveillance internationaux de la tuberculose

- Les données du réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance 1aire/2aire ont été envoyées à l'ECDC et à l'OMS.
- Les données de génotypage (méthode MIURU et séquençage génome entier) des souches MDR ont été envoyées à l'ECDC pour la surveillance des clusters « transfrontaliers » par le réseau ERLN-TB des CNR européens.

Surveillance de la lèpre en France

- 27 cas de lèpre ont été bactériologiquement confirmés en 2017 par le CNR-MyRMA sur le territoire français : 13 à Mayotte, 5 en Nouvelle Calédonie et 9 en métropole chez des migrants de régions où la lèpre est encore présente.

- Analyse rétrospective des 208 cas de lèpre diagnostiqués au CNR-MyRMA entre 2001 et 2016 : 68 en France métropolitaine (1/2 nés en Afrique et 140 dans les DOM-TOM ; 82% nouveaux cas ; 6% résistants aux sulfamides, 1,5 % à la rifampicine, 1% aux quinolones.

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

Tuberculose non MDR

- le génotypage a permis de confirmer une relation entre les cas dans 20 situations soumises à enquête (total 70 cas) qui comportaient chacune de 2 à 7 cas reliés : 6 fois dans un contexte amical, voisinage, lieu de travail, 5 fois au sein de familles, 1 fois au sein d'une entreprise, 5 fois au sein d'une école, 1 fois dans une prison, 2 fois dans au sein de foyers, 1 fois en milieu de soin.

- les clades (lignées, phylums) dominants étaient : Haarlem (n=6), LAM (n=6), Beijing (n=2), Cameroon (n=3).

Tuberculose MDR

L'analyse détaillée des 25 clusters génotypiques totalisant 40 souches MDR-XDR de 2017, et incluant le résistome, a permis de confirmer un lien bactériologique et épidémiologique pour 4 clusters, totalisant 5 cas MDR de 2017 et 6 cas MDR des années antérieures. Une enquête épidémiologique est actuellement en cours pour 10 autres clusters, totalisant 15 cas MDR de 2017 et 20 cas MDR des années antérieures.

Les cas MDR reliés bactériologiquement et épidémiologiquement identifiés en 2017 ont concerné les lignées Beijing et Haarlem.

Contribution aux autorités sanitaires (ARS, InVS, DGS) pour :

-31 épisodes de cas de tuberculose groupés pour lesquels les études de génotypage (empreintes digitales génomiques) avaient permis de conclure, en complément des enquêtes de terrain, à des liens bactériologiques et épidémiologiques. Ces 31 épisodes ont fait l'objet de multiples échanges téléphoniques et de 39 courriers, notamment avec les CLAT correspondants.

- l'épidémie d'infections post-circulation extra-corporelle (CEC) à *M. chimaera*. Le CNR-MyRMA a participé à de nombreuses réunions de travail avec SPF, l'ANSM et les professionnels (chirurgiens, perfusionnistes, hygiénistes...) sur l'organisation d'enquêtes pour recenser les cas survenus en France et sur les protocoles de désinfections et de maintenance des générateurs thermiques, y compris la surveillance microbiologique de l'eau. Nous avons mené l'étude par WGS des souches françaises (cas et environnement).

Information et formation, organisation de contrôle de qualité externe pour les laboratoires

- 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.

- en 2017 accueil de 9 stagiaires pour une durée totale de 47 semaines.

- en 2017 nous avons mené 7 missions : dans le cadre de l'ESCMID, de l'OMS et d'ONG.

Conseils thérapeutiques pour la prise en charge des infections à mycobactéries

167 dossiers ont été discutés par le Groupe thérapeutique au cours des 11 réunions pour 104 patients : 56 cas de tuberculose MDR-XDR de 2017 (dossiers examinés lors de 1 à 4 réunions) ; 25 cas de tuberculose MDR-XDR de 2016 (dossiers examinés lors de 1 à 2 réunions) ; 6 cas MDR-XDR de 2015 (dossiers examinés de 1 à 4 fois) ; 9 sujets contact de cas MDR pour discussion de prophylaxie ; 12 cas de tuberculose compliquée non MDR.

- des avis ont été donnés par les membres du CNR-MyRMA directement en dehors des réunions de RCP, lors d'environ 1500 appels ou e-mails en 2017. La durée totale de ces échanges correspond à plus d'1 mois d'équivalent temps plein de médecin.

- au total, que ce soit au travers des réunions plénières des RCP ou de contacts téléphoniques directs, les 4/5 des cas de tuberculose MDR-XDR identifiés en 2016 ont fait l'objet de conseils thérapeutiques par le CNR-MyRMA, ainsi qu'une trentaine de cas d'infection à MNT pouvant être liés aux soins et d'une cinquantaine de cas suspects de lèpre.

Conseils auprès des autorités sanitaires et scientifiques

Nationales

- MSA (Mutuelle de Santé Agricole) pour la tuberculose bovine.

- ANSM et InVS : surveillance des cas d'endocardites à MNT et suivi de l'épidémie européenne à *M. chimaera*.

- INSERM - AVIESAN : pilotage de « l'Action Tuberculose » de l'institut thématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M) : élaboration des programmes des réunions scientifiques, organisation de symposia.

Internationales

- ERLN-TB : les 2 laboratoires participent au réseau des laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne, pour l'élaboration du programme « tuberculose » de l'ECDC.

- EUCAST (European Union Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) et EMA (European Agency for Medicine) et ESGMYC (ESCMID study group for mycobacterial infections) : élaboration de la méthodologie d'étude des nouveaux antituberculeux.

- OMS « Réseau OMS de surveillance de la résistance aux antiléproux » et au « Technical Advisory Group » : élaboration du programme de lutte mondiale contre la lèpre.

- ESCMID : pilotage du « European Study Group for Mycobacteria (ESGMYC) ».

Publications et communications en relation avec le travail mené au CNR

- 27 publications : 4 nationales, 23 internationales
- 2 chapitres d'ouvrage : 1 en français, 1 en anglais,
- 17 communications : 9 nationales, 8 internationales
- 16 conférences sur invitation : 14 nationales, 2 internationales,
- 5 organisations de colloques / congrès, 1 émission radio

Analytical summary

Public Health issues

There are more than 100 species of mycobacteria, among which:

- pathogenic species responsible for two contagious diseases: tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ...) and leprosy (*M. leprae*, *M. lepromatosis*).
- saprophytic species ("non tuberculous mycobacteria (NTM)": some of them responsible for opportunistic infections (a) in immunosuppressed patients (e.g. *M. avium* and AIDS), (b) as consequences of invasive procedures (surgery, mesotherapy, tattoo...) (e.g. *M. chelonae*, *M. xenopi*, *M. chimaera*) or (c) as complications of chronic respiratory affections such as cystic fibrosis and other chronic bronchopathies (e.g. *M. abscessus*).

Tuberculosis (TB)

~9 millions TB cases occur each year in the world (WHO) (global incidence ~100/105). In France, after an important regression during the last decades, there are ~6000 cases/year (incidence 9/105), concerning especially 2 groups of population: old nation-borns (mainly >60 years) and young foreign-borns (mainly 20-44 years).

Resistance to antituberculous drugs is a major issue due to the risk of failure of the standard treatment (isoniazid [INH], rifampicin [RIF], ethambutol, pyrazinamide 2 months + INH-RIF 4 months). Resistance to INH (CNR-MyRMA data) increased these last years; 4 to 8 % in new cases (1ary resistance) and 16 to 32 % in cases with history of treatment (2ary resistance).

Resistance to both INH+RIF ("multiresistance, MDR-TB") dramatically restricts the therapeutic possibilities, even more in case of additional resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides (e.g. amikacine) ("extensively-resistance, XDR-TB"). In these situations, the mortality rates are high.

In the world (WHO), the number of MDR-TB is estimated at ~500.000 (3 % of 1ary resistance, 20 % of 2ary resistance) and the number of cases XDR is estimated at ~50.000.

In France (CNR-MyRMA data), the MDR-TB cases doubled these last years, up to ~100/year (among which ~20 XDR) and were diagnosed in ~forty distinct laboratories of various sizes and scattered over the French territory. These laboratories usually need external expertise for additional tests, particularly for susceptibility to 2nd line agents.

The evolution of resistance to anti-TB drugs justifies organizing sustained surveillance which is based France on two networks of laboratories with mycobacteriology activity (see infra).

Leprosy

~ 210 000 new cases/year of leprosy occur in the world (WHO). In France, ~100 new cases/year are diagnosed in overseas territories (incidence ~15/105 in Mayotte, an island in Indian Ocean) and imported cases are regularly diagnosed in mainland in migrants from countries with high prevalence (India, Madagascar, Comoros). *M. leprae* cannot grow in vitro but molecular techniques available at CNR-MyRMA allow identifying this species in skin lesions as well as mutations involved in acquired resistance to antileprosy agents.

NTM infections

The number of NTM infections, is estimated between 500-1000 cases/year in France (no system for declaration), raising therapeutic difficulties due to the small number of naturally active antibiotics and the risk of selecting resistant mutants under treatment (e.g. clarithromycin and *M. avium*).

Major facts to be taken into account

Organization of the mycobacteriology in France

The progressive merging of laboratories in reaction to regulations (accreditation, safety ...) led to a decrease in the number of laboratories with activity in mycobacteriology, from 350 in the 1990s to 220 in the 2010s.

University hospital laboratories that have skills in mycobacteriology set up several years ago a network ("Azay-mycobactéries") allowing accurate surveillance based on standardized methodology. These labs (n=38) diagnose ~1/3 of the culture+ (C+) TB cases in France.

Other laboratories (General Hospitals, large private labs, N~180, having fewer skills still diagnose ~2/3 of C+ cases participate in a network organized by CNR-MyRMA, allowing collection of basic information based on simplified methodologies, adapted to the limited time these laboratories can dedicate to.

Technical developments

Genomic amplification kits are nowadays accessible to unspecialized laboratories and it is recommended (2014) to use them for any suspicion of TB with smear+ sputum (presence of acid-fast bacilli, i.e. most contagious cases) for detecting *M. tuberculosis* and resistance to rifampicin (marker of MDR-TB). In spite of the decreased number of laboratories with mycobacteriological activities (cf. above), the diagnoses of TB cases and NTM infections are still scattered among many laboratories with limited expertise in the domain (median 10 cases/year only). That justifies providing the latter laboratories with technical expertise and counselling.

The molecular mechanisms of resistance to antituberculous drugs being chromosomal mutations (no plasmid or transposon of resistance), there are intense industrial efforts to develop genomic kits for detecting these mutations. These kits must be accurately evaluated in term of sensibility and specificity, but also of predictive values by taking into account prevalence of resistance in given epidemiological situations (new cases, relapses, country of birth...).

The interpretation of genomic results being often tricky, it is important to develop training on that aspect. Genotyping aims at (a) comparing strains to investigate bacteriological links between TB cases and (b) investigating the phylogeny within the mycobacterial species, particularly *M. tuberculosis*. Reference routine technique for *M. tuberculosis* (MIRU-VNTR 24 loci ...) is successfully applied to cases with suspected links, and systematically to every MDR-XDR cases (see results section). Progress must be brought for NTMs, species by species, because knowledge is limited in this domain.

Whole genome sequencing (WGS), available in both CNR-MyRMA laboratories, allows an in-depth study of the strains of *M. tuberculosis*, particularly MDR, and of some NTM species (see results section).

In vitro immunological tests (IGRAs) allow diagnosing Mtb infection and are more and more replacing the tuberculin skin tests. IGRAs have to progress to allow differentiating recent/old infections, and predicting the evolution from infection to disease.

Main results obtained in 2017 in the frame of missions

Technical improvement and evaluation of new methods

- Implementation of new workflow for NGS and WGS for clinical isolates of *M. tuberculosis* (Pitie's lab) and non tuberculous mycobacteria (Lariboisiere's lab), especially *M. chimaera*
- Genotypic testing for detection of resistance to linezolid and bedaquiline in MDR strains of *M. tuberculosis* and improvement of genotypic detection of ethambutol resistance (*embC-embA* region)
- Improvement of NTM speciation, especially differentiating *M. chimaera* isolates out of the *M. avium* complex
- Clinical evaluation of the new Quantiferon Gold Plus IGRA testing vs QFT Gold for contact cases

External Quality Control (EQC)

The two NRC labs received EQC from ECDC-ERLTbnet (Instand): (a) clinical samples and strains for microscopy, direct PCR, culture, identification and phenotypic susceptibility testing and molecular detection of resistance; (b) *M. tuberculosis* DNA for phylogenetic genotyping by the MIRU-VNTR method. All results were in the range of QC.

Number of strains and samples received

In 2017, more than 1000 isolates were received at the NRC (55% *M. tuberculosis*, 45% NTM) : 858 for identification, 556 for phenotypic AST, 529 pour pour genotypic AST (+13% vs. 2016), 227 for phylogenotyping et 111 for leprosy. We performed about 2000 genotypic tests (for identification or detection of mutations associated with resistance) and 4000 phenotypic tests (per antimicrobial agent), with 68 WGS analyses.

Identification (ID) on the strains and samples received

Among *M. tuberculosis* complex isolates : 92% *M. tuberculosis*, 6% *M. africanum*, 1% *M. bovis*

Among NTM isolates: 18% *M. avium*, 11% *M. intracellulare*, 16% *M. chimaera*, 15% *M. abscessus*, 8% *M. xenopi*.

Acquired resistance determined by phenotypic testing

- Among the isolates of *M. tuberculosis* complex received for ID or AST, 68% were resistance to at least one of the first line drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin) and 28% were multidrug resistant (MDR, resistant to isoniazid and rifampicin). This shows that we cannot determine the national MDR rate from isolates routinely sent to CNR-MyRMA since there is a bias since they are selected for suspicion of resistance. However, these strains are interesting for the studying the prevalence of resistance mechanisms.

- All MDR were sent to CNR-MyRMA (70-100 isolates per year since 2010, which is the double of what was observed in the years before). In 2017, 82 MDR were studied, among which 10 were XDR.

- Among the MDR isolates, 23% were resistant to at least one second line parenteral drugs (kanamycin, amikacin, capreomycin) and 18% to fluoroquinolones.

Nontuberculous mycobacteria (NTM)

Acquired resistance to antimicrobial agents was observed only in previously treated cases (selection of resistant mutant). Resistance was detected (a) for clarithromycin, in 16% of *M. avium*-*intracellulare* complex isolates, and 6% of *M. abscessus*; (b) for amikacin in 8% of *M. abscessus* and (c) 0% to rifampicin in *M. kansasii*.

Acquired resistance determined by genotypic detection

M. tuberculosis complex

- . rifampicin : *rpoB* mutations detected in all rifampicin-resistant isolates (2/3 harbored the mutation S531L)
- . isoniazid : *katG* mutations S315T in ¾ isolates (high level resistance), promoter region of *inhA* in ¼ isolates (half of them were only in *inhA*, associated with a low level of resistance)
- . pyrazinamide : various *pncA* mutations as described before
- . ethambutol : *embB* mutations at position 306 for X% isolates

- . fluoroquinolones : *gyrA* mutations more frequently at position 94
- . ethionamide : various mutations in *ethA*
- . aminoglycosides : *rrs* mutations

NTM: *rrl* mutations (23SRNA) observed in clarithromycin-resistant isolates and *rrs* (16SRNA) in amikacin-resistant.

M. leprae

No resistant strains were detected among the 27 leprosy cases diagnosed in France in 2017.

Whole genome sequencing

In 2017, 38 *M. tuberculosis* isolates and 30 NTM isolates (20 *M. chimaera* and 10 *M. chelonae*) were studied by NGS for genome sequence analysis. Phylogenetic profile and interstrain comparison were done.

Surveillance of resistance to antituberculous agents through associated networks

Primary and secondary resistance through the network "Azay-mycobactérie" (39 University Hospitals)

- 1674 culture-positive TB cases diagnosed in 2016 (study conducted in 2017)
- main characteristics : 6.7 % previously treated TB; 5.7 % HIV-positive; 67 % born outside France. This latter character increased since 1990 when it was only 35%
- Primary resistance rate (untreated patients): 14.5 % resistance to at least one of the first line drugs; 6.6 % resistance to isoniazid (still increasing from 1995) with 9.6 % in patients born in France but 16.6 % in foreign born patients (p<0.02); 1.7 % to rifampicin
- MDR rate in new cases: 1.9% (doubled from 2009)
- MDR rate in previously treated patients, increased for the last 20 years: 18.9% to isoniazid (16.7 % en 1995), 13.5 % to rifampicin (vs 7.9% en 1995).
- Nearly all MDR cases were foreign borne patients
- Global MDR rate among University hospitals: 3,7 % (23 cases)
- Nearly all cases with rifampicin resistance were also isoniazid resistant, which shows that RIF-resistance is a good marker to detect MDR isolates.

Exhaustive surveillance of multidrug-resistant cases through the lab network of CNR-MyRMA

- 4221 TB culture positive cases were reported in 2016 within the network of 187 laboratories (data collected in 2017), among which more than half were reported in about 20 laboratories (Paris Hospitals, 2 big general hospitals, 2 big private labs et 1 sanatorium lab),
- total MDR cases in 2016 : 70 / 1,7 % rate (IC95 : 1,3-2,1%)
- This MDR rate is inferior to that calculated from the other network (University hospitals Azay, 3.7%), because these hospitals are specialized. This shows the interest of having the two complementary networks.
- MDR rate tripled since 1992 (0,4-0,7% en 1993-1998),
- Half of the cases are diagnosed in Paris and Ile de France region
- Main characteristics of MDR cases are : 62% men, 78% foreign borne (half in Eastern Europe), median age 34yo, 7% HIV+, 81 % pulmonary TB, 49% untreated new case,
- These characteristics mainly changed since 1992 : decrease in the rate of previously treated patients (from 73% to 35%), increase in foreign borne patients (from 51% to 86%, mainly due to Eastern Europe and ex USSR migration)

Surveillance of specific forms of TB

- TB due to *M. bovis* : 2.6% cases reported through the AZAY network, estimation of 60-70 cases in France per year
- TB meningitis : 3 cases among children ≤ 5 yo (indicator for BCG vaccination efficacy).

Participation in international surveillance networks

- Data from the Azay network on primary and secondary resistance were given to ECDC and WHO-Europe.
- Genotyping results (MIRU and WGS) of MDR strains were given to ECDC- ERLN-TB for trans-country clusters.

Surveillance of leprosy

- 27 cases of multibacillary (MB) form of leprosy were diagnosed in 2017: 13 in Mayotte, 5 in New Caledonia and 9 in France mainland from people originated from leprosy endemic countries.
- Among 208 MB cases diagnosed by the CNR-MyRMA from 2001 to 2017, 68 were living in France mainland (1/2 born in Africa) and 140 were born in French territories; 82% were new cases ; 6% dapsone-résistant, 1.5 % rifampicin-resistant and 1% fluoroquinolone-resistant.

Genotypic study of clinical isolates of *M. tuberculosis* for epidemiological purpose

Non-MDR TB

- by MIRU-VNTR genotyping, we confirmed epidemiological links between TB cases in 20 different situations (70 cases total with 2 to 7 cases per cluster) : 6 friendly relationships or neighborhood, or working place, 5 times transmission among the family, 1 situation of an intra-company transmission, 5 times with a school transmission, 1 intra-prison transmission, 2 times within migrant houses, once in healthcare setting.
- Major clades (lineages, phylums) were Haarlem (n=6), LAM (n=6), Beijing (n=2), and Cameroon (n=3).

MDR-TB

Out of 25 clusters genotyped by MIRU-VNTR (40 MDR-XDR isolates) in 2017 and comparing also the resistome, we confirmed a genomic and epidemiological link for 4 clusters including 5 MDR cases diagnosed in 2017 and 6 cases previously diagnosed. These cases belong to Beijing and Haarlem lineages.

Epidemiological investigation is still ongoing for 10 other clusters (15 MDR cases diagnosed in 2017 and 20 cas MDR previously diagnosed).

Involvement in health authorities' actions for specific events

- more than 40 phone calls and mailings concerned 31 TB cases for which genotyping revealed genomic and epidemiological links.
- several meetings with SPF, ANSM, DGS and medical professionals (surgeons, perfusionists, infection control specialists...) about the post cardiac surgery outbreak of invasive *M. chimaera* infections. CNR-MyRMA worked together with them on new investigations, protocols for disinfecting water contained in the heater-coolers (HC). In addition, we compared by WGS the strains from patients and water contained in the HC. We also prepare a new protocol for detection of *M. chimaera* in water from HC.

Information, training, involvement in quality control for clinical laboratories

- Our website (<http://cnrmyctb.free.fr>) is regularly updated: (a) clinical report from to be sent with the isolate, (b) forms for annual surveys, (c) results of yearly surveillance, (d) publications of CNR-MyRMA, (e) annual reports (f) slides and presentation for workshop and education courses organised by CNR-MyRMA.
- in 2017, we had 9 fellows coming for a total of 47 weeks.
- en 2017, CNR-MYRMA followed 7 missions outside France for ECDC, ESCMID, WHO and NGOs.

Counselling for difficult to treat mycobacterial infections (therapeutic consilium)

- the therapeutic consilium for MDR TB discussed 167 times during 11 regular meetings about 104 patients : 56 MDR-XDR cases diagnosed in 2017 (discussed one to four times); 25 MDR-XDR TB cases diagnosed in 2016 (discussed one to two times) ; 6 MDR-XDR cases diagnosed in 2015 (discussed one to four times) ; 9 persons in contact with MDR TB cases for prophylaxy advice ; 12 non MDR TB cases with complications.
- More than 1500 phone calls and emails were distributed in 2017 for TB, NTM and leprosy suspected cases. This was estimated to last for at least the time spent by one medical full time person per year.

Counselling to health and scientific authorities

Nationales

- MSA (Mutuelle de Santé Agricole) and LNR (ML Boshiroli) for bovine tuberculosis.
- ANSM et InVS for surveillance of endocarditis due to NTM and other healthcare infections, including the worldwide epidemic *M. chimaera* infection.
- INSERM - AVIESAN : workshop team on TB for the Thematic group on infection « Institut thématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M) : scientific meetings, grant review, symposia

Internationales

- ERLTB-Net-ECDC : the 2 CNR-MyRMA laboratories belong to the network of TB national reference laboratories sponsored by the ECDC for the last eight years.
- CNR worked for EUCAST (European Union Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) and EMA (European Agency for Medicine) and ESGMYC (ESCMID study group for mycobacterial infections) about the new antituberculous antimicrobial agents.
- WHO : we are member of the WHO surveillance network for drug resistance in leprosy and member of the technical advisory group of Global leprosy programme of WHO (Delhi). We participated to the new strategy 2016-2020 and the the new guidelines for leprosy eradication.
- ESCMID: chair of European Study Group for Mycobacteria (ESGMYC)

Publications and communications on the theme

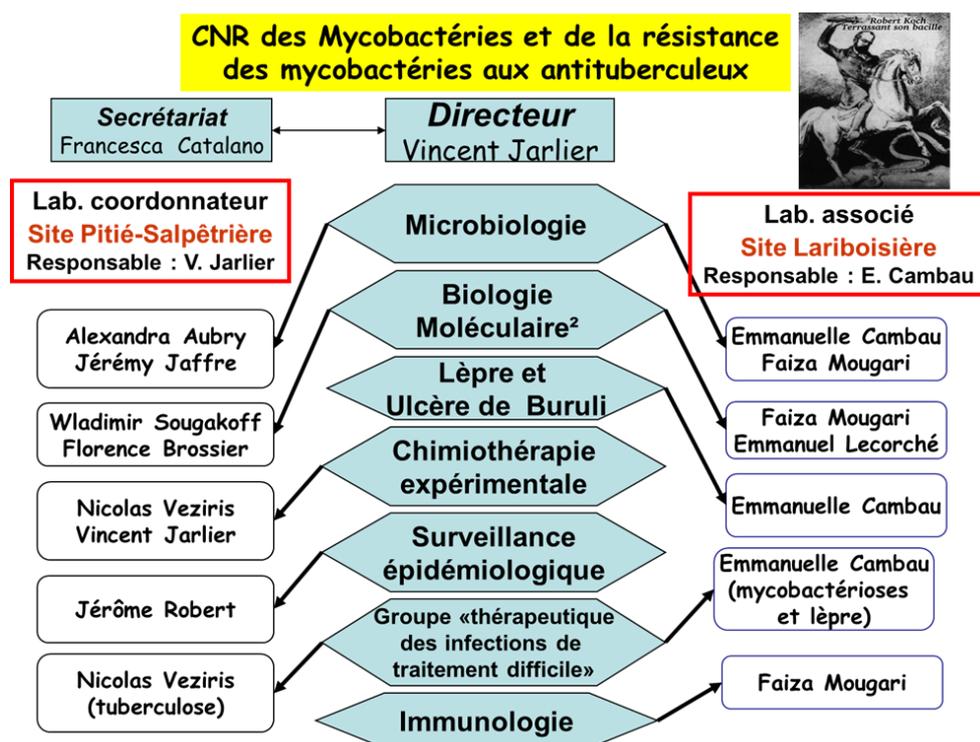
- 27 publications, 4 in French, 23 international in English
- 2 book chapters: 1 in French, 1 in English
- 17 communications at conferences, 9 nationals, 8 internationals
- 16 invited speeches: 14 at national meetings, 2 at international meetings
- 5 conference or workshop organized by CNR, 1 radio speech

1. Missions et organisation du CNR-MyRMA

Les missions des 2 laboratoires du CNR-MyRMA n'ont pas été modifiées et sont exposées dans l'annexe 1.

Le CNR-MyRMA repose sur 2 laboratoires de bactériologie médicale dont les activités sont complémentaires (cf. organigramme ci-dessous) ce qui permet de répondre à l'ensemble de ses missions.

Organigramme du CNR-MyRMA



Nom des personnes assurant les fonctions de responsables adjoints du CNR : Pr Emmanuelle Cambau et Pr Jérôme Robert

Degré d'avancement de la démarche qualité (accréditation) : cf annexe 1.

Fiche d'identité des deux laboratoires du CNR-MyRMA
(Site Internet : <http://cnrmyctb.free.fr>)

1. Laboratoire coordonnateur

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière-Charles Foix
Site Pitié-Salpêtrière
47-83 Boulevard de l'hôpital 75634 PARIS cedex 13
+33 (0) 1 42 16 20 70 secrétariat,
+33 (0) 1 42 16 20 83 bureau médical
Fax : +33 (0) 1 42 16 20 72
Email : cnr.myctb@aphp.fr
Responsable médical et scientifique : Pr Vincent JARLIER
Email : vincent.jarlier@aphp.fr
Responsable administratif : Serge MOREL, Directeur du groupe hospitalier

1. Laboratoire associé

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal
Site Lariboisière
2, rue Ambroise Paré 75010 Paris
+33 (0) 1 49 95 65 51 secrétariat
+33 (0) 1 49 95 65 54 bureau médical
Fax : +33 (0) 1 49 95 85 37
Responsable médical et scientifique: Pr Emmanuelle CAMBAU
Email : emmanuelle.cambau@aphp.fr
Responsable administratif : Bénédicte ISABEY, Directrice de l'hôpital Lariboisière

2. Activités d'expertise

Améliorations techniques et évaluation des trousse

- Mise au point d'un nouvel workflow pour le séquençage du génome entier de *M. tuberculosis* (Pitié-Salpêtrière) et des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) (Lariboisière)
- Introduction de tests génotypiques pour détecter la résistance au linézolide et à la bédaquiline chez les souches MDR de *M. tuberculosis* et amélioration de la détection de la résistance à l'éthambutol par ajout de la région promotrice (*embC-embA*)
- Amélioration de l'identification des MNT en particulier des souches du complexe *M. avium*, afin de distinguer *M. chimaera* responsable d'une épidémie mondiale d'infections cardio-vasculaires post-CEC
- Evaluation de la trousse quantiféron Gold plus vs Gold pour les sujets contacts lors d'enquête autour de cas

Contrôles externes de qualité

Contrôles de qualité externe (CQE) européens (ECDC-ERLTBnet, Instand) faits dans les deux laboratoires: (a) prélèvements et souches pour examen microscopique, culture, identification, tests de sensibilité, amplification génique et détection moléculaire de la résistance, (b) suspensions d'ADN de *M. tuberculosis* pour génotypage MIRU-VNTR. Tous les résultats étaient conformes.

Nombre de souches et prélèvements reçus

Nous avons reçus au CNR-MyRMA en 2017 un peu plus de 1000 souches (55% *M. tuberculosis*, 45% MNT) : 858 pour identification, 556 pour tests phénotypiques de résistance, 529 pour tests génotypiques de résistance (+13% vs. 2016), 227 pour génotypage et 111 pour diagnostic de lèpre.

Le CNR-MyRMA a effectué plus de 2000 analyses génotypiques (gènes étudiés pour identification ou recherche de mutations de résistance), plus de 4000 tests phénotypiques (antibiotiques testés) et 68 séquençages complets de génomes (WGS).

Identification des espèces sur les souches reçues

M. tuberculosis complex : 92% *M. tuberculosis*, 6% *M. africanum*, 1% *M. bovis*

MNT: 18% *M. avium*, 11% *M. intracellulare*, 16% *M. chimaera*, 15% *M. abscessus*, 8% *M. xenopi*.

Résistance phénotypique acquise des souches

M. tuberculosis complex

- 68% de résistance à au moins un antituberculeux 1ère ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine), dont 28% multirésistantes (MDR, résistantes à l'isoniazide et la rifampicine). Ce n'est pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour expertise que l'on peut établir des statistiques représentatives de résistance en France car ces souches sont en général adressées précisément pour suspicion de résistance. En revanche, l'analyse des souches reçues permet une étude précise des mécanismes de résistance prévalents en France.

- Le CNR reçoit la totalité des souches MDR-XDR identifiées en France, nombre qui a doublé depuis 7 ans (70 à 100 cas/an) : 82 cas MDR dont 10 cas XDR en 2017.

- Résistance aux principaux antituberculeux de 2ème ligne parmi les souches MDR : 23% à au moins un des 3 aminosides (kanamycine, amikacine, capréomycine) et 18% aux fluoroquinolones.

Mycobactéries non tuberculeuses

La résistance acquise n'est trouvée que chez les souches de patients déjà traités (résistance 2aire par sélection de mutants résistants sous traitement) : (a) clarithromycine : 16% chez *M. avium-intracellulare* complex, 6% *M. abscessus*; (b) amikacine 8% chez *M. abscessus*; (c) 0% à la rifampicine chez *M. kansasii*.

Mutations impliquées dans la résistance acquise

M. tuberculosis complex

. rifampicine : gène *rpoB* chez toutes les souches résistantes (dont 2/3 mutation S531L)

. isoniazide : ¾ de mutations S315T dans *katG* (résistance de haut niveau), ¼ région régulatrice du gène *inhA* (dont la moitié des souches ayant cette mutation isolée ce qui génère une résistance de bas niveau)

. grande diversité des mutations dans le gène *pncA* pour le pyrazinamide

. position 306 du gène *emB* pour l'éthambutol

- . gène *gyrA*, plus fréquent à la position 94,
- . grande diversité de mutations dans le gène *ethA* pour l'éthionamide (
- . gène *rrs* pour les aminosides.

Mycobactéries non tuberculeuses

Mutations dans le gène *rrl* (ARN 23S) pour la clarithromycine et dans le gène *rrs* (ARNr16S) pour l'amikacine.

M.leprae

Aucun cas de résistance aux antilépreux parmi les 27 cas de lèpre bactériologiquement confirmés en 2017.

WGS

38 souches de *M. tuberculosis* et 30 souches de MNT (20 *M. chimaera* et 10 *M. chelonae*) ont été séquencées pour analyse phylogénique ou comparaison en cas d'épidémies.

2.1. Evolutions des techniques et travaux d'évaluation

Mise au point d'un nouvel workflow pour le séquençage génomique de *M. tuberculosis* et des MNT (cf § WGS 2.5)

Amélioration de l'identification des souches de MNT en particulier celles du complexe *M. avium*

Nous avons affiné en 2017 les méthodes d'identification des MNT par spectrométrie de masse en Malditof, en utilisant la base de données Saramis (Lever C *et al*).

Nous avons particulièrement travaillé sur les techniques d'identification de *M. chimaera* afin que les laboratoires puissent rapidement reconnaître ce pathogène impliqué dans une épidémie mondiale d'infections post-CEC. Nous avons comparé des techniques moléculaires « maison » (séquençage ITS, *rpoB*, *hsp65*), des techniques commerciales (Innolipa®, Genotype®NTMDR) et la spectrométrie Malditof, et avons montré que la technique la plus précise et la plus rapide était l'hybridation reverse basée sur les troussees Innolipa® et Genotype® (Lecorche E *et al*.)

Techniques génotypiques de détection en routine de la résistance à la bédaquiline et au linezolid

Le séquençage des gènes *Rv0678* et *atpE*, codant pour le régulateur transcriptionnel de la pompe d'efflux *MmpL5* et la sous-unité c de l'ATP synthase, a été introduit en routine en 2017 pour recherche de la résistance à la bédaquiline.

Le séquençage des gènes *rrl* et *rpIC*, codant pour l'ARN 23S et la protéine ribosomale L3, a été introduit en routine en 2017 pour recherche de la résistance au linezolid.

Amélioration de la détection en routine de la résistance à l'éthambutol

Malgré le séquençage complet du gène *embB* seulement 80% des souches phénotypiquement résistantes à l'éthambutol sont détectées génotypiquement. C'est pourquoi nous avons décidé d'introduire en 2017 le séquençage systématique de la région intergénique *embC-embA* (promoteur de *embB*).

-Mise au point d'un nouvel workflow pour le séquençage du génome entier de *M. tuberculosis* (Pitié-Salpêtrière) et des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) (Lariboisière)

Evaluation de la trousse quantiféron Gold plus vs Gold pour les sujets contacts lors d'enquête autour de cas

Le Quantiféron Gold (QFT Gold) est un test indirect de recherche de l'infection par *M. tuberculosis* qui mesure la production d'IFN- γ suite à la stimulation des lymphocytes CD4 par antigènes peptidiques ESAT-6, CFP-10 et TB7.7. Le test QFT Gold Plus a remplacé le QFT Gold avec la distinction d'un tube TB1 stimulant les lymphocytes CD4 ; comme dans le QFT Gold mais avec un cocktail d'antigènes légèrement différents, et un tube TB2, stimulant les lymphocytes CD8.

Nous avons conduit avec le CLAT 75, une étude observationnelle descriptive réalisée comparant les résultats du QFT Gold et Gold chez les sujets contacts de cas de TM. Parmi 177 sujets inclus (78 hommes, 99 femmes avec un âge médian de 36 ans [18-74 ans]), 62% étaient nés en pays d'incidence < 20 /100 000 habitants. Seul deux tests avaient des résultats indéterminés pour les deux tests (1,2%). Le taux de positivité était de 16% pour les 2 tests avec pourtant 11 résultats discordants. Pour ces discordants, 7 tests avaient des valeurs proches du seuil de positivité déterminé par le fabricant à 0,35 UI/ML. En tenant compte du coefficient de variation que nous avons mesuré à 17% sur la base des

contrôles de qualité, le seuil corrigé variait entre 0,29 et 0,41 UI/ml, ce qui permettait de n'avoir plus que 4 tests discordants. Le taux de positivité des 2 tests était plus élevé dans les groupes de contact les plus à risque d'ITL à savoir, en milieu familial, chez les sujets nés en pays d'incidence >20 000/100000 habitants, avec un temps d'exposition supérieur à 40 heures.

En conclusion, nous n'avons pas observé de différence entre les 2 tests avec un même niveau de sensibilité, et un même taux de positivité d'ITL. La prise en compte du coefficient de variation du seuil permettrait peut être d'avoir un résultat plus juste, les résultats proches du seuil étant les plus à risque d'être mal interprétés.

2.2. Techniques transférées vers d'autres laboratoires, CQE organisé pour les autres laboratoires nationaux

Les techniques transférées vers d'autres laboratoires correspondent à celles figurant dans la liste des techniques commercialisées recommandées par le CNR-MyRMA aux laboratoires pratiquant la mycobactériologie en annexe 2.

En 2017, nous avons conçu et organisé, à la demande de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), un CQE pour l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie en France (dont les laboratoires des CHU du réseau « AZAY-mycobactéries »).

Ce CQE portait sur l'identification des mycobactéries et les tests de sensibilité de *M. tuberculosis* complex.

Résultats de la partie identification

Parmi les 83 laboratoires pratiquant la mycobactériologie, les résultats d'identification des NTM étaient les suivants :

- ✓ souche de *M. fortuitum* : 59 *M. fortuitum*, 2 *M. fortuitum* complex, 22 mycobactérie non tuberculeuse
- ✓ souche de *M. intracellulare* : 48 *M. intracellulare*, 7 *M. chimaera*, 2 *M. avium* complex, 2 *M. intracellulare* groupe, 2 *M. intracellulare*/*M. chimaera*, 1 *M. avium*/*M. intracellulare*/*M. scrofulaceum*, 21 mycobactérie non tuberculeuse
- ✓ souche de *M. tuberculosis* : 49 *M. tuberculosis* complex, 33 *M. tuberculosis*, 1 *M. canettii*

Résultats de la partie antibiogramme

Parmi les 51 laboratoires pratiquant l'antibiogramme, les résultats rendus par les laboratoires étaient les suivants :

Souche de *M. tuberculosis* sensible aux antituberculeux de 1ère ligne :

- ✓ Rifampicine : 46 sensible, 1 résistant, 4 absences de réponse
- ✓ Isoniazide : 46 sensible, 1 résistant, 4 absences de réponse
- ✓ Ethambutol : 45 sensible, 2 résistant, 4 absences de réponse
- ✓ Streptomycine* : 34 sensible, 12 résistant, 5 absences de réponse

*souche présentant une proportion anormalement élevée de mutants résistants à la streptomycine

Souche de *M. tuberculosis* isolément résistante à l'isoniazide :

- ✓ Rifampicine : 49 sensible, 2 absences de réponse
- ✓ Isoniazide : 1 sensible, 48 résistant, 2 absences de réponse
- ✓ Ethambutol : 48 sensible, 3 absences de réponse
- ✓ Streptomycine : 47 sensible, 1 résistant, 3 absences de réponse

Souche de *M. tuberculosis* isolément résistante à la rifampicine :

- ✓ Rifampicine : 48 résistants, 3 absences de réponse
- ✓ Isoniazide : 48 sensible, 3 absences de réponse
- ✓ Ethambutol : 48 sensible, 3 absences de réponse
- ✓ Streptomycine : 47 sensible, 1 résistant, 3 absences de réponse

2.3. Collections de souches

Comme dit dans l'annexe, toutes les souches de mycobactéries reçues sont stockées et consignées dans le fichier informatique correspondant.

2.4. Résultats des expertises

Les délais de culture des mycobactéries étant très longs (jusqu'à 2 mois pour certaines souches ou espèces), nous **procédons d'abord à des tests génotypiques qui permettent de générer des informations plus précoces** importantes pour les prises de décisions médicales.

Les **délais habituels de rendu des résultats** par rapport à l'arrivée d'une souche (non contaminée et en quantité suffisante, ne nécessitant pas de repiquage) au laboratoire sont les suivants :

- identification de l'espèce : 4 à 7 jours,
- génotype partiel de résistance aux antibiotiques (**4 antibiotiques**) par amplification-hybridation sur bandelettes : 4 à 7 jours,
- génotype complet de résistance par séquençages de l'ensemble des **17 gènes** d'intérêt : 3 semaines à 1 mois (des résultats partiels peuvent être rendus plus tôt si nécessaire),
- antibiogramme phénotypique complet pour **13 antibiotiques** pour *M. tuberculosis*: 2 à 2,5 mois.

Evolution des activités d'expertise du CNR- MyRMA de 2010 à 2017

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Souches soumises à identification^a	794	988	897	900	871	801	752	858
<i>M. tuberculosis</i>	366	385	430	492	501	417	393	460
Mycob. atypiques	428	603	467	408	370	384	359	398
Souches soumises à tests phénotypiques de sensibilité	468	551	542	464	548	508	480	556
<i>M. tuberculosis</i> ^b	160 (126)	170 (139)	217 (164)	211 (181)	236 (212)	240 (188)	214 (162)	277 (228)
Mycob. atypiques	308	381	325	253	312	268	266	279
Souches soumises à tests génotypiques de sensibilité	223	278	358	325	434	435	468	529
<i>M. tuberculosis</i>	201	232	284	267	281	285	236	280
Mycob. atypiques	22	46	74	78	153	150	232	249
Souches soumises à génotypage épidémiologique^c	153	119	276*	203	227	194	160	227
<i>M. tuberculosis</i>	153	119	267*	198	225	174	153	197
Mycob. atypiques	-	-	9	5	2	20	7	30
Biopsies lèpre^d	25 (7)	51 (22)	53 (24)	45 (25)	87 (31)	70 (30)	74 (23)	111 (27)

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

c : empreintes digitales génomiques (épidémiologie)

d : dont (N) biopsies positives à *M. leprae* et soumises à des tests génotypiques de résistance.

*Rattrapage de l'année 2010. Moyenne sur les 2 années =197

A. Identification des souches

858 souches de mycobactéries reçues en 2017 ont été soumises à identification : 460 souches étaient du complexe *M. tuberculosis* et 398 étaient des mycobactéries non tuberculeuses.

A.1. Souches de *M. tuberculosis* complexe

Parmi les 460 souches de *M. tuberculosis* complexe reçues en 2017, 424 (90%) ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce. Le pourcentage d'identification à l'espèce bien supérieur aux autres années (49% en 2016) est lié au changement de stratégie du CNR mis en place fin 2016. En effet, il a été décidé d'identifier jusqu'à l'espèce toutes les souches du complexe. Cette décision a été prise début 2017 (cf projet pour la mandature) pour ne pas manquer une éventuelle augmentation des cas à *M. bovis* (demande de SPF). Avant 2017, cela était fait lorsque le laboratoire envoyeur le demandait, ou lorsque les aspects culturels (milieu solide) évoquaient une espèce autre que *M. tuberculosis* (*M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*...).

Parmi ces 424 souches on note (tableau ci-dessous):

- **390 *M. tuberculosis* (92%)**, espèce principale responsable de tuberculose humaine,

- **5 *M. bovis* (1%)**. Depuis 2010, ce nombre est compris entre 5 et 13, suggérant qu'il n'y a pas d'augmentation évidente de tuberculose à bacille bovin en France. Le fait que ce nombre n'augmente pas alors même que le nombre de souches identifiées jusqu'au niveau de l'espèce a beaucoup augmenté est un autre élément suggérant très fortement l'absence d'augmentation de tuberculose à bacille bovin en France
- **5 *M. bovis* var *BCG* (1%)** (nombre en baisse par rapport à 2015, mais dans la lignée des années précédentes),
- **24 *M. africanum* (5,6%)**. Depuis 2010, ce nombre est compris entre 6 et 24.

Identification des souches de *M. tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA 2010-2017

Espèces	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Identification au sein du complexe	157	242	201	277	189	191	194	424
<i>M. tuberculosis</i>	140	212	164	240	153	169	168	390
<i>M. bovis</i>	6	12	13	11	11	6	4	5
<i>M. africanum</i>	6	7	8	15	8	14	9	24
<i>M. bovis</i> var <i>BCG</i>	5	9	13	11	16	2	12	5
<i>M. caprae</i>								0
<i>M. canettii</i>		1	3					0
<i>M. microti</i>		1			1		1	0
<i>M. tuberculosis</i> complex sans identification au sein du complexe	209	143	229	215	312	226	198	36
Total <i>M. tuberculosis</i> complex	366	385	430	492	501	417	393	460

A.2. Souches de mycobactéries non tuberculeuses

La répartition des principales espèces parmi les 398 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2017 était la suivante (Tableau ci-dessous) :

- **180 souches (45% du total) du complexe *M. avium* (MAC)** dont 72 *M. avium*, 45 *M. intracellulare* et 63 *M. chimaera*. Parmi ces souches, 75 (42%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **34 souches de *M. xenopi* (8% du total)** parmi lesquelles 31 (86%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **87 souches de *M. abscessus* (22% du total)** : 62 *M. abscessus* subsp. *abscessus*, 16 *M. abscessus* subsp. *bolletii*, 9 *M. abscessus* subsp. *massiliense* :
 - 74 étaient issues de prélèvements respiratoires (48 issues de patients atteints de mucoviscidose) dont 57 considérés comme responsables d'infections
 - 11 de prélèvements cutané-muqueux (7), articulaire (1), ganglion (1), os (1), hémoculture (1), toutes considérées comme responsables d'infections.
- **13 souches de *M. chelonae*** dont 11 considérées comme responsables d'infections extra-respiratoires (10 cutané-muqueuse et 1 d'infection profonde avec une septicémie) et 2 d'infections pulmonaires.
- **18 souches de complexe *M. fortuitum* et apparentés** (dont 11 *M. fortuitum fortuitum*, 2 souches de *M. porcinum*, 1 *M. conceptionense*, 1 *M. smegmatis*, 1 *M. septicum*, 2 appartenant au complexe mais sans identification connue, 1 *M. peregrinum*, 1 *M. mucogenicum*) : 6 souches responsables de colonisation ou d'infection respiratoire, 9 d'infections cutané-muqueuses, 2 d'infections ostéo-articulaires, 1 d'adénopathie.
- **12 souches de *M. kansasii* (3% du total)**, agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose, toutes considérées comme responsables d'infections.
- **11 souches de *M. simiae*** dont 8 considérées comme responsables d'infection.

Une partie des souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2017 (n = 15 soit 4% du total) appartenait à d'autres espèces que celles-ci-dessus. En raison de la diminution du budget, nous n'avons pas procédé à leur identification qui est en général longue et coûteuse.

Au total, 284 des 398 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2017, soit 66%, étaient responsables d'infections, dont :

- **246 espèces à croissance lente** (essentiellement *M. avium* complex, *M. xenopi*, *M. kansasii*), le plus souvent responsables d'infections respiratoires,
- **124 d'espèces à croissance rapide**, le plus souvent responsables d'infections respiratoires (par exemple dans le cadre de la mucoviscidose pour *M. abscessus*) et d'infections cutanées et des tissus mous (*M. chelonae*, *M. fortuitum* et *M. abscessus*) mais aussi de quelques infections profondes ou disséminées chez des patients immunodéprimés.

Ce pourcentage élevé est en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses activités sur les souches importantes sur le plan médical.

Tendances évolutives 2006-2017

La distribution entre les principales espèces de mycobactéries non tuberculeuses d'intérêt médical (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*) est restée stable entre 2010 et 2017 (**Tableau ci-dessous**). L'augmentation du nombre de souches de *M. chimaera* est liée à l'intérêt récent porté à cette espèce qui n'était pas auparavant différenciée de *M. intracellulare*.

Principales espèces (importance numérique ou médicale) des souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2017

Espèce	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>M. avium</i>	96 (22%)	116 (19%)	100 (21%)	99 (24%)	93 (25%)	63 (16%)	69 (19%)	72 (18%)
<i>M. intracellulare</i>	82 (19%)	103 (17%)	105 (22%)	66 (16%)	71 (19%)	53 (14%)	42 (15%)	45 (11%)
<i>M. chimaera</i>				17 (4%)	5 (1%)	29 (8%)	44 (12%)	63 (16%)
<i>M. xenopi</i>	52 (12%)	54 (9%)	49 (10%)	48 (12%)	40 (11%)	40 (10%)	36 (10%)	34 (8%)
<i>M. chelonae</i>	31 (7%)	44 (7%)	40 (9%)	11 (3%)	17 (4%)	26 (7%)	21 (6%)	13 (3%)
<i>M. kansasii</i>	24 (6%)	26 (4%)	17 (3%)	18 (4%)	9 (2%)	13 (3%)	13 (4%)	12 (3%)
<i>M. abscessus*</i>	35 (8%)	54 (9%)	44 (9%)	40 (10%)	61 (16%)	43 (11%)	39 (11%)	62 (15%)
<i>M. bolletii</i>	10 (2%)	10 (2%)	7 (1%)	7 (2%)	10 (3%)	13 (3%)	14 (4%)	16 (4%)
<i>M. massiliense</i>	9 (2%)	18 (3%)	12 (3%)	9 (2%)	2 (1%)	17 (4%)	13 (4%)	9 (2%)
<i>M. fortuitum</i>	11 (3%)	25 (4%)	21 (4%)	14 (3%)	12 (3%)	15 (4%)	8 (2%)	11 (3%)
<i>M. simiae</i>	7	11	7	6	5	7	8 (2%)	11 (3%)
<i>M. gordonae</i>	20	23	16	15	9	5	0	16 (4%)
<i>M. peregrinum</i>	6	12	9	3	2	3	1	2 (0,5%)
<i>M. interjectum</i>	0	2		1	1		1	0
<i>M. mucogenicum</i>	8	11	2	2	5	7	5 (1%)	2 (0,5%)
<i>M. scrofulaceum</i>	4	2		2	1	1	0	3 (0,5%)
<i>M. szulgai</i>	3	8	6	4	6	6	2 (1%)	4 (1%)
<i>M. marinum</i>	2	3	4	8	4	5	0	2 (0,5%)
<i>M. arupense</i>	2	5	2	2	1		3 (1%)	1 (0,3%)
<i>M. genavense</i>	3	2	2	1	0	5	1	2 (0,5%)
<i>M. haemophilum</i>	0	0		1	0		1	0
<i>M. malmoense</i>	2	6	1	7	2	2	4 (1%)	1 (0,3%)
<i>M. ulcerans</i>	1	0			0			2 (0,5%)
Autres espèces	20 (5%)	56 (9%)	23 (5%)	27 (7%)	14 (4%)	31 (8%)	29 (8%)	15 (4%)
Total	428	601	467	408	370	384	359	398
Infections** : N	308	381	325	341	334	291	284	265
%	72%	62%	70%	84%	89%	76%	79%	(66%)

**M. abscessus* subsp. *abscessus*

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

Dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt en 2007 de l'obligation vaccinale par le BCG, 2 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2017 (*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, a baissé depuis (Tableau ci-dessous).

Evolution de 2006 à 2017 du nombre de souches de mycobactéries non tuberculeuses 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
2015	4
2016	6
2017	2

B. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

B.1. Tests phénotypiques de sensibilité des souches de *M. tuberculosis* complex

Les tests de sensibilité sur **277 souches de *M. tuberculosis* complex** reçues pour cela en 2017 ont été :

- un **antibiogramme « standard de 1^{ère} ligne »** (antituberculeux de 1^{ère} ligne) seulement pour **36 souches**, le plus souvent pour vérification des résultats trouvés dans les laboratoires d'origine
- un **antibiogramme « complet »** (antituberculeux de 1^{ère} ligne et de 2^{ème} ligne) pour **228 souches**, dont **82 envoyées pour multirésistance** et **146 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**).
- un **antibiogramme partiel pour un seul antibiotique** pour **13 souches** (pour le pyrazinamide, pour vérification du résultat du laboratoire d'origine)

Résistance aux antituberculeux de 1^{ère} ligne de 277 souches reçues en 2017

- **32%** (n=89) étaient **multisensibles**, c.a.d. sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine)
- **68%** (n=185) étaient **résistantes** à au moins un des 4 antibiotiques ci-dessus, dont **28%** (n=76) étaient **phénotypiquement multirésistantes** (MDR) c.a.d. résistantes à l'isoniazide et à la rifampicine. (tableau ci-dessous).
- **3 souches reçues pour multirésistance apparaissaient en fait encore sensibles *in vitro* à la rifampicine malgré la présence de mutations dans le gène *rpoB*** (D516Y (x2), L511P) qui entraînent une diminution de l'activité de cet antibiotique n'allant pas jusqu'à la résistance. Ces 3 souches, très anormales, ont quand même été considérées comme MDR dans nos rapports statistiques « TB-MDR ».
- **3 souches reçues pour multirésistantes et effectivement de génotype MDR** étaient trop **dysgoniques** (subculture négative ou faible) pour permettre des tests phénotypiques de sensibilité

Entre 2010 et 2017, la proportion de souches multisensibles est restée très basse (~1/3) 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 qui peuvent plus facilement être prises en charge par les laboratoires de mycobactériologie de routine, en dehors de situations particulières, par exemple suspicion de résistance finalement non confirmée, intolérance aux antituberculeux de première ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats.

Ce n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour tests de sensibilité que l'on peut établir des statistiques représentatives de la sensibilité 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 »).

Phénotypes de résistance aux antituberculeux de première ligne des souches de *M. tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2017

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Sensible*	59 (37%)	51 (30%)	62 (29%)	67 (32%)	59 (25%)	75 (34%)	55 (30%)	89 (32%)	
H	13	21	20	19	30	25	33	47	
S	7	6	7	4	4	2	4	34	
R	4	5	9	9	11	2	2	4	
Résistant à au moins 1 antibiotique mais non multirésistant	E	0	0	1	0	0	1	0	2
H+S	23	22	14	28	22	20	22	19	
H+E	1	0	0	1	3	0	1	2	
H+S+E	7	1	1		2	1	4	1	
R+S			1		0	0	0	0	
R+E			1		0	0	0	0	
R+S+E	-	-	-	1	0	2	0	0	
Sous-total	55 (35%)	55 (33%)	54 (25%)	61 (29%)	72 (31%)	53 (24%)	66 (35%)	109 (40%)	
Multirésistant	H+R	5	7	22	13	15	12	10	15
H+R+S	12	16	21	16	12	16	15	19	
H+R+E	2	6	7	8	5	18	3	10	
H+R+S+E	26	35	51	46	73	46	36	32	
Sous-total	45	64	101	83	105	92	64	76^s	

	(28%)	(37%)	(47%)	(39%)	(44%)	(42%)	(35%)	(28%)
TOTAL GENERAL	159	170	217	211	236	220	185	274[§]

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

[§] + 3 souches dysgoniques non évaluables, cf texte

Résistance aux antituberculeux de 2ème ligne de 228 souches reçues en 2017

- Résultats pour les 82 souches reçues pour multirésistance (MDR) :

Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient les suivantes (**Tableau ci-dessous**) : streptomycine 67%, éthambutol 53%, pyrazinamide 48%, éthionamide 23%, cyclosérine 13%, PAS 9% et, pour les antituberculeux qui entrent dans la définition de l'ultrarésistance (XDR), **au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 23%, fluoroquinolones 18%**.

Ces chiffres ont peu évolué depuis 2010, à part l'augmentation passagère en 2013-14 des % de résistances aux aminosides de réserve et aux fluoroquinolones et la nette diminution du % de résistance à l'éthionamide en 2017.

Il faut noter qu'il y a déjà en France 3% de souches MDR qui sont résistantes à la bédaquiline, antibiotique pourtant utilisé depuis peu.

La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **aussi** aux fluoroquinolones **et** à au moins un aminoside de réserve (XDR) était de **12%** soit **10 cas de tuberculose XDR identifiées en 2017** (cf. **Tableau ci-dessous**).

Résistance phénotypique (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M. tuberculosis*complex reçues pour multirésistance (MDR) au CNR-MyRMA de 2010 à 2017

Années		2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
(n souches testées)		(45)	(64)	(92)	(83)	(111)	(98)	(71)	(79 [§])
a	Ethambutol	66	70	58	66	70	65	55	53
	Pyrazinamide				40	50	43	48	48 [¶]
	Streptomycine	75	80	70	73	81	69	72	67
b	Amikacine	13	9	13	20	12	14	12	4*
	Kanamycine	20	23	27	41	31	26	20	22*
	Capréomycine	12	11	14	23	18	13	14	5*
c	Fluoroquinolones	23	22	28	30	39	20	17	18 [§]
d	Ethionamide	75	82	62	73	64	71	52	23
e	PAS	9	17	17	24	14	5	10	9 [¶]
	Cyclosérine	9	18	28	24	19	10	13	13
	Bédaquiline					3	2	0	3
	Linezolid	0	0	1	0	1	1	1	4

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 de « dernière ligne »

* 3 résistantes aux 3 aminosides

[§] parmi ces souches résistantes à 2 mg/l d'ofloxacine (n=14) (définition OMS de la résistance aux fluoroquinolones), 5 (36%) restaient sensibles à 2 mg/l de moxifloxacine.

[¶] seules 56 et 68 souches (71% et 86%) ont pu bénéficier respectivement d'un test de sensibilité au pyrazinamide et au PAS en raison d'un défaut d'approvisionnement du fournisseur

[§] 3 des 82 souches reçues, trop dysgoniques, n'ont pas pu être testées phénotypiquement

- Résultats pour les 146 souches reçues 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. suspicion initiale de multirésistance mais non confirmée, effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine...) (**tableau ci-dessous**) que parmi les souches reçues pour multirésistance, ce qui est bien sûr logique : **0% à l'amikacine, 2% aux fluoroquinolones, 0,7% à l'éthambutol.**

La faible proportion de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches non MDR (1% pour la période 2010-2017) est rassurante car l'utilisation large de cette famille d'antibiotiques dans la communauté (infections urinaires, respiratoires etc...) fait craindre une émergence plus marquée de la résistance parmi les souches de *M. tuberculosis*complex sensibles aux antituberculeux de 1ère ligne et, à

terme, l'impossibilité d'utiliser cette classe pour les traitements antituberculeux de 2^{ème} ligne.

Résistance (%) aux antibiotiques de 1^{re} et 2^e ligne des souches de *M. tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2017 pour antibiogramme de 2^e ligne, dans un contexte autre que la multirésistance (suspicion initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1^{re} ligne...)

Années (n souches)	2010 (81)	2011 (75)	2012 (67)	2013 (98)	2014 (101)	2015 (90)	2016 (91)	2017 (146)
Ethambutol	13	13	3	5	4	2	5	1
Streptomycine	43	43	28	36	22	24	26	20
Amikacine	3	3	0	1	0	1	0	0
Fluoroquinolones	0	0	1	2	2	0	0	2
Ethionamide	59	59	66	40	62	-*	-*	-
PAS	11	11	3	8	8	6	5	2

n.b. l'éthionamide, non utilisé hors multirésistance, n'est plus testé systématiquement sur les souches non MDR

Il faut noter (a) la **stabilité** du nombre de **souches MDR** reçues de **2001 à 2010** (moyenne 48 cas/an), (b) **l'augmentation** en 2011 (69 cas), (c) **la stabilisation** entre en 2012 et 2015 **autour d'une centaine de cas annuels** et enfin (d) **la légère diminution** en 2016 (n=71) et 2017 (n=82), le nombre de **souches MDR étant resté ces 2 dernières années très supérieur à celui d'avant 2010**.

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, 26 en 2014 puis **a diminué à 10 en 2015, 6 en 2016** avant de remonter **à 10 en 2017**.

Fait important en matière de surveillance, la proportion des souches MDR identifiées par l'enquête systématique auprès des laboratoires du réseau CNR-MyRMA (cf. section surveillance) et qui ont effectivement été reçues au CNR-MyRMA pour études *in vitro* (tableau ci-dessous) a augmenté entre les périodes 2001-02 (~60 %) et 2010-15 (98-100 %). **Le CNR-MyRMA reçoit donc maintenant la quasi-totalité des souches MDR de France, en cohérence avec les recommandations du HCSP.**

Evolution de 2001 à 2017 du nombre de souches MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA (cf surveillance). Exhaustivité de l'envoi des souches MDR au CNR-MyRMA

	Souches MDR reçues au CNR-MyRMA	Cas MDR recensés par le réseau CNR-MyRMA	Exhaustivité envoi souches (%)	Souches XDR reçues CNR-MyRMA	% XDR parmi MDR reçues au CNR- MyRMA
2001	29	48	60	0	0
2002	47	79	59	1	2
2003	60	77	78	2	3
2004	51	68	75	1	2
2005	60	65	92	1	2
2006	53	60	88	2	4
2007	38	44	86	2	5
2008	51	57	89	2	4
2009	48	48	100	4	8
2010	45	47	96	6	13
2011	69	75	92	6	8
2012	92	94	98	17	18
2013	83	82	100	22	27
2014	111	110	100	26	23
2015	98	95	100	10	10
2016	71	70*	100	6	8
2017	82	nd*	nd*	10	12

* ce nombre sera disponible en 2019 via l'enquête annuelle du réseau CNR-MyRMA (cf § surveillance)

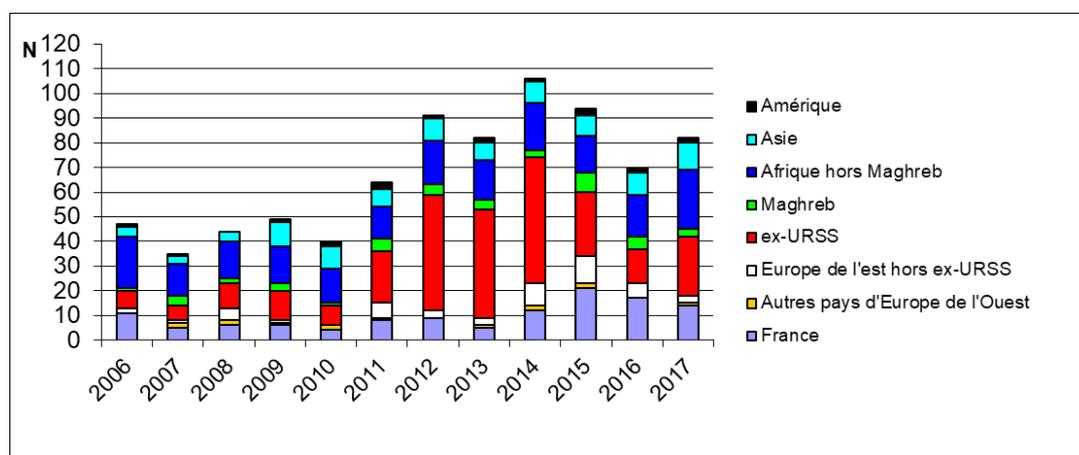
Evolution 2006-2017 de la distribution par pays de naissance des patients porteurs des souches MDR reçues au CNR-MyRMA

Le **grand tableau** placé en annexe au §B (rapport trimestriel envoyé aux autorités sanitaires) montre la **distribution des pays de naissance des cas de tuberculose MDR correspondants aux souches reçues de 2006 à 2017**.

On voit :

- que les nombres de souches MDR de patients nés dans les pays d'Asie et d'Amérique sont restés stables sur cette période.
- une nouvelle augmentation du **nombre de souches MDR de patients nés dans les pays d'ex-URSS et d'Europe de l'Est en 2017 (n=27) après 2 années de réduction (37 cas en 2015 et 20 cas en 2016) par rapport au pic de 2014 (n=61)**. Cette augmentation est presque entièrement due à la très **nette progression du nombre de cas MDR de patients nés en Géorgie** (n = 19 en 2017 contre 3 cas en 2016) sans toutefois retrouver les niveaux des années 2012-2014.
- **une augmentation de la proportion de cas MDR issus de pays d'Afrique hors Maghreb en 2017** (29% contre 17 à 24% sur la période 2011-2016) principalement liée aux patients originaires du Mali et du Soudan.
- une **légère diminution du nombre et de la proportion de souches MDR de patients nés en France** par rapport aux 2 années précédentes (6 à 11/an en 2006-2013, 15 en 2014, 23 en 2015, **17 en 2016 et 14 en 2017**) ; donnée plutôt satisfaisante mais qui mérite d'être surveillée de près.
- le retour « à la normale » du nombre de souches MDR de patients nés au Maghreb confirmé en 2017(1 à 5/an en 2006-2014, 8 en 2015, **5 en 2016 et 3 en 2017**).

La Figure ci-dessous montre l'évolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance de 2006 à 2017. **En 2017, cette distribution est assez homogène** et est proche de celle de la décennie précédente. En effet, les cas MDR de 2017 sont principalement dus aux patients nés en France, en ex-URSS et en Afrique (hors Maghreb).



Evolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance de 2006 à 2017

Le **tableau ci-dessous** montre que la majorité (50%) des souches MDR reçues en 2017 étaient adressées par des laboratoires de la **région Ile de France (n=41)** comme en 2014 et en 2015 (n.b. présentation selon la **nouvelle organisation régionale**). Les deux autres régions les plus concernées par l'envoi de souches MDR en 2017 étaient les régions Nouvelle Aquitaine et Auvergne-Rhône-Alpes. A noter que 4 souches MDR reçues au CNR en 2017 ont été adressées par le laboratoire du Centre Hospitalier de la Polynésie Française.

Répartition par régions des laboratoires ayant envoyé l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR au CNR-MyRMA depuis 2014 (selon la nouvelle organisation régionale)

Régions	N souches reçues en			
	2014	2015	2016	2017
Auvergne, Rhône-Alpes	13	11	5	5
Bourgogne, Franche-Comté	2	0	1	
Bretagne		2	2	3
Centre-Val-de-Loire	2	1	1	3
Corse	1	1		
Grand-Est	5	3	4	2
Guadeloupe				
Guyane				
Hauts-de-France	8	6	4	4
Île-de-France	58	48	32	41

La Réunion	2			1
Martinique				
Mayotte				
Normandie	6	3	3	4
Nouvelle-Aquitaine	2	11	6	6
Nouvelle Calédonie				1
Occitanie	7	5	2	3
Pays de la Loire		4	2	3
Polynésie Française			1	4
Provence-Alpes-Côte d'Azur	6	3	8	2
Total	112	98	71	82

Evolution du nombre de souches XDR reçues au CNR-MyRMA et de la distribution par pays de naissance des patients

Le **Tableau ci-dessous** montre la nette diminution du nombre de cas XDR depuis le pic de 2014 (n=26) avec seulement **6 cas XDR en 2016 et 10 en 2017**. **Ce chiffre est en hausse en 2017 par rapport à 2016 mais reste globalement stable sur ces 3 dernières années (environ 10% des cas MDR)**.

Les patients d'ex-URSS représentaient 1/3 des cas de tuberculose XDR sur la période 2004-2008, 2/3 des cas entre 2009 et 2011, et la quasi-totalité des cas depuis 2012. Cette tendance a évolué en 2016 avec une distribution équivalente du nombre cas XDR nés en France (n=3) et nés dans un pays de l'ex-URSS (n=3). **En revanche, en 2017, les patients d'ex-URSS représentent à nouveau la quasi-totalité des cas XDR (90%) et sont très largement dus aux patients nés en Géorgie (7 cas sur 9)**

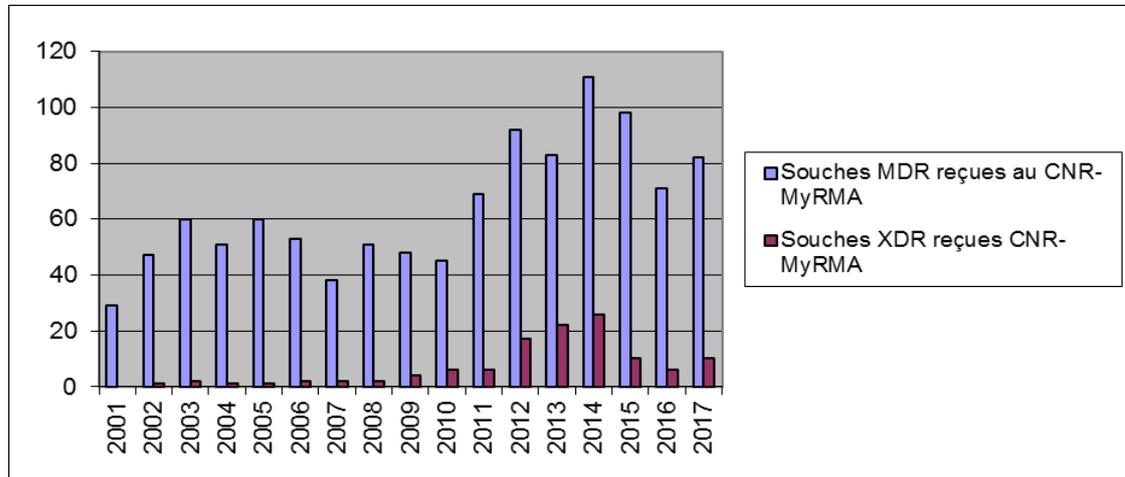
A noter qu'un **seul cas XDR sur les 10 est né en France** ; donnée satisfaisante qui mérite d'être surveillée de près.

Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyRMA de 2004 à 2017

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 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
2015	1 (France)			9 (5 Géorgie, 2 Tchétchénie, 1 Russie, 1 Arménie)	10

2016	3 (France)	3 (1 Tchétchénie, 1 Moldavie, 1 Géorgie)	6
2017	1 (France)	9 (1 Lituanie, 1 Russie, 7 Géorgie)	10

La Figure ci-dessous montre l'augmentation de la proportion des souches XDR parmi les souches MDR de 2001 à 2014 : 2-3% (2002 – 2005), 4-5% (2006-07), 8% (2009), 13% (2010), puis environ 20% de 2012 à 2014. Cette proportion est à la baisse depuis 2015 (10%) et la tendance s'est confirmée en 2016 (8%) et 2017 (12%) pour retrouver son niveau de 2009.



Evolution de la distribution des cas MDR et XDR de 2001 à 2017

Tendances évolutives 2006-2017

Le nombre moyen de **souches MDR** reçues au CNR-MyRMA, qui était resté à peu près stable jusqu'en 2010 **autour d'une moyenne de 48 par an**, a **augmenté** en 2011 (n=69) pour atteindre une centaine de cas par an entre 2012 et 2015. **Ce nombre est redescendu à 71 cas en 2016 et 82 cas en 2017 mais reste toutefois au-dessus de la moyenne de la période avant 2010.**

Il faut noter l'augmentation du nombre de cas MDR de patients nés en France : 5 à 11/an jusqu'en 2013 mais 14 à 23 cas/an depuis 2014.

Le nombre de **souches XDR**, qui était de 1 ou 2 par an de 2006 à 2008 (idem depuis 2002), a **augmenté** à 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011, 17 en 2012, 22 en 2013 et enfin 26 en 2014. **Ce nombre est redescendu à 10 en 2015 puis 6 en 2016 et 10 en 2017.**

La proportion de souches XDR parmi les souches MDR a donc beaucoup augmenté, de 2-3% pour la période 2002-05, à 4-5% en 2006-07, 8% en 2009, environ 20% de 2012 à 2014, puis est redescendue à 10% en 2015 puis 8% en 2016 et enfin 12% en 2017. Ces variations sont principalement en lien avec le nombre de **patients porteurs de souches XDR originaires de l'ex-URSS, en particulier la Géorgie** qui, après avoir **fortement augmenté (de 5 en 2010 à 23 en 2014)**, a **diminué en 2015 (n=9) et 2016 (n=3) avant de repartir à la hausse en 2017 (n=9).**

Le nombre de **souches « pré-XDR »** (c'est-à-dire MDR résistantes aux fluoroquinolones **ou** à un des trois aminosides de réserve) **a beaucoup augmenté** : 8 en moyenne par an de 2006 à 2010 mais environ 20 par an depuis 2011 (**n=22 en 2017**).

Le CNR-MyRMA reçoit la totalité des souches MDR de France.

Depuis 2013, le CNR-MyRMA envoie chaque trimestre à SPF et à la DGS un bilan évolutif des souches MDR-XDR reçues au CNR, incluant les pays de naissance (cf. exemple joint en annexe).

B.2. Tests phénotypiques de sensibilité des souches de mycobactéries non tuberculeuses, tendances évolutives

Au total 279 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2017 ont fait l'objet de tests

de sensibilité aux antibiotiques.

Le CNR-MyRMA concentre ses efforts en matière de tests de sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries non tuberculeuses sur les cas d'infections, en particulier ceux ayant déjà fait l'objet d'un traitement (échecs thérapeutiques et rechutes). En effet, les infections à mycobactéries atypiques n'étant pas contagieuses, il n'y a pas de résistance primaire (c.a.d. résistance chez un patient n'ayant pas reçu de traitement) mais seulement de la résistance secondaire (c.a.d. acquise lors d'un traitement). Ceci a été bien démontré par une publication récente du CNR-MyRMA (Renvoisé *et al.* Antimicrob. Agents Chemother. 2015)

Les résultats pour les 245 souches des espèces médicalement importantes sont présentés ci-après.

***M. avium* complex** : parmi les 180 souches reçues en 2017, 96 (46 *M. avium*, 23 *M. intracellulare* et 32 *M. chimaera*) ont fait l'objet d'un antibiogramme (53%) dont 12 (12%) étaient intermédiaires ou résistantes à la clarithromycine (CMI \geq 64 mg/l en milieu 7H9). Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement (n=64), 10 avaient une souche résistante, soit **16% de résistance secondaire** (aucun cas de résistance primaire).

M. xenopi : parmi les 34 souches reçues en 2017, 23 ont fait l'objet d'un antibiogramme. Aucune n'était résistante à la clarithromycine. Seuls 3 patients avaient des antécédents de traitement. Il faut signaler en 2017 : 2 souches de ***M. xenopi*** résistantes à la rifampicine (1 des 2 patients n'avait apparemment pas reçu de traitement par rifampicine).

M. kansasii : Parmi les 12 souches reçues en 2017, 10 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante à la rifampicine. **Aucune des 54 souches de *M. kansasii* reçues entre 2012 et 2017 n'a été trouvée résistante à la rifampicine** y compris pour les 8 patients ayant des antécédents de traitement.

Espèces à croissance rapide : 116 souches ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques. Pour ces espèces, un antibiogramme phénotypique est réalisé par la méthode de microdilution. Par ailleurs, pour *M. abscessus*, l'étude du gène *erm(41)*, plus fiable que les tests phénotypiques, est utilisée pour déterminer le profil de résistance naturelle à la clarithromycine. La présence de ce gène confère une résistance naturelle, dont les séquevars C/T28 déterminent le caractère inductible ou constitutif (cf plus loin détection des résistances génotypiques).

- Parmi les 85 souches de *M. abscessus* testées, la résistance à la clarithromycine était observée comme attendu selon chaque sous-espèce :

- *M. abscessus subsp. abscessus* (n=61):
 - 54 souches ont montré une résistance naturelle inductible se matérialisant par une augmentation de la CMI entre la lecture précoce à J3-J5 et la lecture à J14
 - 7 autres souches trouvées phénotypiquement sensibles, mais pour lesquelles l'approche génotypique a permis de mettre la résistance en évidence (cf plus loin).
- *M. abscessus subsp. massiliense* (n=9) : 7 souches ont montré une sensibilité naturelle à la clarithromycine mais 2 souches avaient une résistance acquise de haut niveau (CMI > 16 mg/l d'emblée)
- *M. abscessus subsp. bolletii* (n=15) : 15 souches ont montré une résistance naturelle inductible.
- 6 souches (5 *M. abscessus*, 1 *M. massiliense*) avaient une résistance acquise à l'amikacine. Elles étaient toutes isolées de prélèvements respiratoires chez des patients atteints de mucoviscidose.

- Parmi les 18 souches du complexe *M. fortuitum*:

- 9 *M. fortuitum fortuitum*, 2 *M. porcinum*, 1 *M. conceptionense*, 1 *M. smegmatis*, 1 *M. septicum* étaient résistantes à la clarithromycine (résistance naturelle)
- 2 souches d'autres espèces non connues étaient sensibles.
- 1 souche de *M. mucogenicum* et 1 *M. peregrinum* étaient sensibles.
- Toutes étaient sensibles aux fluoroquinolones

- Parmi les 13 souches de *M. chelonae*, toutes étaient normalement sensibles aux macrolides

Par ailleurs, 34 souches d'espèces rares ont été testées pour accumuler des données sur leurs profils encore mal connus de sensibilité phénotypique naturelle aux antibiotiques. Les résultats

ne sont pas présentés ici.

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

556 souches reçues en 2017 (+ 13% par rapport à 2016) ont été soumises à des tests de détection moléculaire rapide de mutations impliquées dans la résistance :

- **280 souches de *M. tuberculosis*** pour la rifampicine et/ou 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.

Au total **1769 recherches génotypiques de résistance** ont été effectuées pour *M.tuberculosis*.

- **249 souches de mycobactéries non tuberculeuses** pour la clarithromycine et les aminosides.

- **27 souches de *M. leprae*** pour la rifampicine, les quinolones et la dapsone.

En 2017, le CNR CNR-MyRMA était en mesure d'analyser 19 gènes impliqués dans la résistance acquise à 14 antibiotiques (rifampicine, isoniazide, fluoroquinolones, pyrazinamide, streptomycine, amikacine, kanamycine, capréomycine, éthambutol, éthionamide, bédaquiline, linézolide, macrolides, sulfamides) : *rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *gyrB*, *pncA*, *rrs* (*rrs500*, *rrs900*, *rrs1400*), *eis*, *tlyA*, *embB*, région entre *embC* et *embA*, *ethA*, *ethR*, *atpE*, *Rv0678*, *rrl*, *rpIC*, *erm(41)*, *folP*.

C.1. Mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* complex

Le nombre de recherches de mutations a augmenté de 42% en 2017 et a doublé depuis 2010 (Tableau ci-dessous).

Nombre de recherches génotypiques de résistance sur les souches de *M. tuberculosis* complex reçues de 2010 à 2017

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Rifampicine	201	232	284	267	281	285	231	280
Isoniazide	198	227	280	263	284	285	236	278
Pyrazinamide	137	183	217	211	225	210	179	250
Fluoroquinolones	128	183	231	215	232	238	185	267
Ethionamide	50	79	103	93	119	106	70	89
Aminosides	56	99	159	121	156	156	172	244
Ethambutol	62	105	159	121	155	222	172	254
Linezolid								78*
Bédaquiline								29*
Total	832	1109	1433	1291	1452	1502	1244	1769

*Mise en place en 2017, cf § nouvelles techniques

Rifampicine (RIF)

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBDR*plus*® a permis d'identifier des **mutations dans *rpoB* pour 90 des 280 (32%) tests réalisés en 2017 (Tableau ci-dessous).**

La distribution des mutations était comme suit :

- 55 mutations S531L (61% des mutations)

- 7 mutations D516V (8%)

- 3 mutations sur le codon H526 (3%)

- **25 mutations (28% des mutations) réparties entre les codons 505 et 533 et dont la nature précise n'a pas été déterminée par séquençage en 2017 contrairement aux années précédentes (partie en jaune du tableau ci-dessous)** en raison de la réduction du budget.

La part dominante de la mutation S531L du gène *rpoB* dans la résistance à la rifampicine reste de l'ordre de 2/3 depuis 2010, en accord avec les données publiées à l'étranger. **En 2017, toutes les souches phénotypiquement résistantes à la rifampicine avaient une mutation 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).

Distribution des mutations du gène *rpoB* identifiées dans les souches de *M. tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2010 à 2017 pour détection moléculaire de la résistance à la rifampicine (techniques : GenoType®MTBDR*plus* complété par séquençage génique jusqu'en 2016)

Mutations identifiées par GenoType®MTBDR <i>plus</i>	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
S531L	37	58	76	66	78	74	43	55
H526Y	4	6	3	1	3	5	5	2
H526D	4	6	6		6	3	5	1
D516V	1	1	2	2	8	2	4	7
mutations dont la nature n'a pas été précisée en 2017 (cf texte)								25
D516Y		3	2	4	4	2	3	
D516G							1	
Délétion N519		2						
L511P	2			3		2	1	
Q513P		1	2		1			
Q513K			1				1	
Q513E			1	1				
L521V			1		1			
S522Q					1	1		
H526N							1	
S531W		2	1	1	3		1	
S531F		1	1	4	4	1	1	
L533P	3	2	1	2	9	10	2	
F505L + D516Y				1		1		
S509T + S522W		1						
S509T + D516Y		1				1		
Q510H + H526R		1						
L511P + D516G		1	3	1				
L511P + M515V			1					
L511P + H526N				1				
L511R + D516Y		3						
L511P + 1546-1547insT(516)			1					
S512I + H526N			1					
M515I + D516Y						1		
D516G + L533P				1				
D516E + H526N						1	1	
H526Q + L533P						1		
H526N + G534A							1	
Délétion		1	1		1	1		
Insertion					1	1	1	
Mutation entre 516 et 522			3					
Total avec mutation	54	94	114	95	126	112	71	90
Pas de mutation	147	138	161	162	151	165	153	183
PCR négatives + ininterprétables			9	10	4	8	7	7
Total général	201	232	284	267	281	285	231	280

Isoniazide (INH)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBDR*plus* a permis d'identifier des **mutations dans *katG* ou *inhA* pour 131 des 236 (56%) souches testées en 2017 (Tableau ci-dessous) :**

- **117 fois (76%) une mutation S315T de *katG***, corrélée à une résistance phénotypique à haut niveau à INH, dont 104 mutations isolées et 13 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA*,
- 3 fois (2%) une mutation dans *katG* à une position autre que 315,

- 40 fois (**26%**) une mutation dans la **région régulatrice du gène *inhA*** qui est corrélée, lorsqu'elle est isolée (n=18, 12%), à une résistance phénotypique à bas niveau à INH. **La mutation de type « -15 c>t » était la plus fréquente (n=32, 21%).**

Tendances évolutives 2010-2017 : on note la part dominante de la mutation isolée S315T dans le gène *katG*, qui représente environ **75% des cas** (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 20% des cas.**

Les souches résistantes à l'isoniazide pour lesquelles il n'a pas été détecté de mutation ni dans *katG-315* ni dans les régions régulatrice et codante de *inhA* représentent 2,5 à 9% de l'ensemble des souches testées selon les années. **Les 2 gènes étudiés permettent donc de détecter génotypiquement 91 à 97,5% des souches phénotypiquement résistantes.**

Distribution des mutations des gènes *katG* et *inhA* dans les souches de *M. tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2010 à 2017 pour détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide (techniques : GenoType®MTBDRplus complété par séquençage, en particulier pour region codante de *inhA*)

Mutations	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
KatG S315T	49	76	101	106	102	91	83	104
KatG 315 autre que S>T	-	3	1	1	1			2
KatG autre que S315	7	12	10	7	5	5	12	3
Promoteur <i>inhA</i>	24	21	13	22	21	31	19	27
dont -15	24	20	13	22	21	26	18	21
Partie codante de <i>InhA</i>	1	2		4	1	4	3	4
Partie codante de <i>InhA</i> et promoteur <i>inhA</i>	1							
KatG S315T et promoteur <i>inhA</i>	8	10	9	6	21	18	13	13
Autre combinaison KatG et <i>InhA</i>					1		1	1
Total avec mutation(s)	89	124	132	146	152	149	131	154
Pas de mutation	109	103	140	112	119	127	99	114
PCR négatives + ininterprétable			8	5	13	9	6	10
Total général	198	227	280	263	284	285	236	278

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 250 souches en 2017** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).

Au total, **44 souches (18%) avaient une mutation du gène *pncA* (Tableau ci-dessous)**. 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 de nombreuses années car un tel tableau serait trop long.

Distribution des mutations du gène *pncA* dans les souches de *M. tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA entre 2012 et 2017 pour détection moléculaire de la résistance au pyrazinamide (technique : séquençage *pncA*)

Mutations	2012	2013	2014	2015	2016	2017
R2W						1
L4W ou S	1	4	1		1	
I5T		1		1		
I6L	1	1		1		
V7A ou L	1	1	1		1	
D8G ou E			2			1
V9A ou G	2	2				
Q10H ou R	1		1	1		
D12Y ou A ou N ou G			2	2		1
F13V				2		
G17C ou D	1			1	1	
V21A ou G					1	1
L27P				1		
I31S			1		1	
H43Y		1				1
W34STOP						1
T47P ou A		4	2			

K48N				1		
D49G ou A ou Y	1	1		2	3	
H51R ou P ou Y		1	1		4	
H57D*	6	3	5	2	2	
H57R			1	1	2	
F58L ou S	2	1		1		
P62T ou L		1		3		
D63A			2			3
Y64D			1			
S67P			1			
W68 C ou R		1			3	2
H71R ou Y ou P ou Q	2	4	9	2		3
T76P				1	2	
G78D						1
L85R ou P	2	1	1			
T87M	2	1	1			1
T87M + N149D					1	
V93A				1		
F94L ou C			1			1
Y95STOP	1					
K96Q ou T ou E ou N	2	2			3	
G97C ou S ou R ou D	1		4	3		
Y99S			1			
A102V		1				
Y103STOP	1					
S104R	2			2		
F106S			1			
G108R	1					
T100P				1		
L116R ou P	2			1		1
W119L ou C ou R		2	2	2		
L120R ou P		1	1			
R121P			1			
V125G					1	
D126N					1	
V128G		1				1
G132D	1					
A134G ou V				1	1	2
T135P			3			1
D136N						1
C138R		1				
V139M ou A	2	3			1	
Q141P		3	5	2		
R140S ou P			2	2	1	
Q141P					1	3
T142R ou M ou A		3			2	2
A146T ou V	2		3	5		4
R148C						1
V155G ou M					2	
L156P						1
L159R	3					
T160K		1				
A165V						1
T167I	4	1	2	1	1	
M175V ou T ou K	1	2	2			
V180G					1	
L182S				1	1	1
P77L + V131G		1				
STOP187D						1
Délétion dans <i>pnca</i>	8	4	4	1	2	4
Insertion dans <i>pnca</i>	5	5	7	8	2	2
Codon stop			1	2	1	
Mutation promoteur						1
Total mutations	58	59	72	55	43	44
PCR négatives	3	7	5	10	4	11
Pas de mutation	156	145	148	145	132	195
Total général	217	211	225	210	179	250

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

Fluoroquinolones (FQ)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBR*sl*, a permis d'identifier des **mutations** dans le gène ***gyrA*** dans **19 des 267 souches étudiées (7%)** (Tableau ci-dessous). Le codon **le plus souvent modifié** étaient le **codon 94 (9/19)**.

Il faut noter 1 souche sensible aux quinolones mais portant un polymorphisme de *gyrA* ne conférant pas

la résistance (T80A+A90G).

La recherche de mutations dans le gène *gyrB* n'a pas été réalisée en 2017 contrairement aux années précédentes (**partie en jaune du tableau ci-dessous**) en raison de la réduction du budget..

Distribution des mutations des gènes *gyrA* et *gyrB* dans les souches de *M. tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA de 2010 à 2016 pour détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones (technique GenoType®MTBDRsl complété par séquençage *gyrA* et *gyrB*)

Gène	Mutations*	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>gyrA</i>									
Mutations identifiées par GenoType®MTBDRsl									
	A90V	3	3	7	11	12	3	1	4
	S91P	1	3			1		1	5
	D94A	3	3	7			1	1	1
	D94H		2				1	1	
	D94G	2	1	8	12	22	11	3	6
	D94N ou Y	1	4	4	1	7	5	3	2
Autres mutations identifiées par séquençage									
	T80A**	5	3	1	2	5	1	5	
	G88C ou A				1	1			
	D89N	1							
	Q101E								
	T80A** + A90G				2				
	T80A** + A90E								1
	A90V + D94Y								
	A90V + D94V		3						
	A90V + D94H			2					
<i>gyrB</i>									
	S470I	1							
	R467P**				1				
	P478A**			1					
	R485H								
	S486Y		1						
	D500A ou V					1			
	D500N	1			1				
	A506G								
	R521G**						1		
	D533A**						1		
	N538D			1					
	N538K			1					
	E540V		3						
	E540A	1							
	E540D			1					
	A543V	1					1		
	A547V								
	G551R					1			
	G559A**		2	1	1		1	3	
	R485C + A543V			1			1		
<i>gyrA</i> + <i>gyrB</i>									
	D94A + A543V			1	1				
	A90V + A543V					1			
	A90V + I545S							1	
Total mutations		20	28	36	33	51	27	19	19
Pas de mutation non interprétables		108	155	194	175	177	209	164	238
				6	7	4	2	2	10
Total général		128	183	231	215	232	238	185	267

* numérotation *M. tuberculosis*; ** polymorphisme sans lien avec la résistance aux quinolones

Ethionamide (ETH)

Le séquençage des gènes *ethA* et *ethR*, codant pour la monooxygénase EthA et son régulateur EthR, est effectué depuis 2012. Il a été effectué **pour 89 souches en 2017**. Des mutations (**Tableau ci-dessous**) ont été détectées chez 28 souches (31%).

Tendances évolutives 2021-2017 : On note la très grande diversité des mutations identifiées dans EthA, tant en nature qu'en position sur la protéine, diversité qui rend difficile l'interprétation de l'effet de chacune de ces mutations. Des travaux spécifiques seront encore nécessaires pour avancer sur ce point.

Distribution des mutations des gènes *ethA* et *ethR* dans les souches de *M. tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA en 2017 pour détection moléculaire de la résistance à l'ethionamide (technique : séquençage)

Gène	Mutations	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>ethA</i>	M1R				1		
	A19V (plus EthR-V199A)				1		
	G11D ou S	1	1	2			
	S15P				1		
	H22P	1					
	C27W		1				
	G42V + P334A	1					
	F48S		1				
	Y50C		1				
	S55C		1				
	G63D			1			
	F66L + G199D	1					
	G78D + wt	1					
	A89E + S266R						1
	D95N				1		
	R99G	1					
	W109STOP					1	
	G124D					1	
	C131Y					1	
	E132STOP						1
	L136R				1	1	
	G139D					1	
	Y140STOP	2					2
	Y147STOP	1					
	Q165P	4				1	
	H166P			1			
	W167G	2		1			
	W167STOP						
	W167S + S266R						
	I178S				1		
	S183R				1		
	G184A						
	P192S						1
	P192T						1
	V202G					1	
	Q206STOP	1					
	R207L ou C						1
	S208STOP	1	1				
	Y211C						
	Y211S		1				1
	I212M					1	
	V238G	1	1	1			
	R239L			1			
	Q254A					1	
	P257S		2				
	M260I						
	R261W	1					
	S266R		3	2			
	Q269STOP	2	2	1			
	P275S						
H281P		1			1	2	
R292STOP							
C294Y				1	2		
L301P							
I305N	1						
I305S						1	
T314I					1	1	
P334A					1		
I337V			1				
I338S			1		2		
T341I			1				
T342K						1	
Q359STOP							
M372R			1				
P378L							
N379D			1				
G385D	2						
C403R	1				1	1	
G413D				1			
P422L			1		1		
L440P			1	1			
R441C						1	
Q449R	1						

	D464G		1				
	R483T	1					
	Délétion + I337V	1					
	Délétion + D95N				2		
	Délétions	12	13	17	16	9	9
	Insertions	6	5	3	4	1	2
ethR	T149A	1					
	M102T + délétion ethA			1			
Zone intergénique	-68 A->G	3		1	5	2	
	-66-65 ins CG	1					
ethA plus ethR	ethA S266R, ethR D23G						1
	ethA W167S + S266R, ethR S131R						1
	ethA H22P, ethR F110L				1		
ethA plus zone intergénique	ethA Q269STOP, -9 A->G						1
	délétion dans ethA, -9 A->G						1
	ethA A89E + R99Q + S266R, -9 A->G				1		
Total mutations		51	46	38	48	30	28
Pas de mutation		49	42	74	56	36	54
PCR négatives		3	3	7	2	4	7
Total général		103	91	119	106	70	89

Aminosides

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, **244 souches ont été étudiées en 2017**. Les résultats montrent la présence d'une **mutation a1401g** pour 2 d'entre elles (1%). Le séquençage du gène *eis* a été réalisé en complément de l'analyse du gène *rrs* pour recherche de résistance à la kanamycine dans 10 souches qui montraient toutes un gène sauvage.

Ethambutol

Le système d'amplification-hybridation GenoType® MTBRs/ utilisé seul jusqu'en 2014 pour la recherche de mutations dans le gène *embB* n'étant pas assez performant pour identifier la résistance à l'éthambutol, **nous effectuons depuis 2015 le séquençage complet du gène *embB* et de son promoteur**, qui permet la détection d'un plus grand nombre de mutations impliquées dans la résistance à l'éthambutol (par exemple, G406D/S/A/ ou C). Malgré le séquençage complet du gène *embB* seulement 80% des souches phénotypiquement résistantes à l'éthambutol sont détectées génotypiquement. C'est pourquoi nous avons décidé d'introduire **en 2017 le séquençage systématique de la région intergénique *embC-embA* (promoteur de *embB*)** (cf nouvelles techniques).

Au total, 254 souches ont été étudiées en 2017 et la présence d'une mutation du gène *embB* a été détectée pour 58 d'entre elles (23%) (Tableau ci-dessous). Parmi ces 58 souches, 35 (60%) avaient une mutation du codon EmbB-306 : M306V (n=17), M306I (n=17) et M306L (n=1). Les autres codons dominants dans EmbB étaient les codons 497 (n=5), 406 (n=3) et 354 (n=3), les autres étant plus rares. En 2017, 4 souches avaient une mutation dans le promoteur *embB* : -8c→a (n=1), -12c→t (n=2) et -16c→t (n=1).

Distribution des mutations des gènes *embB* et son promoteur dans les souches de *M. tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA en 2015 et 2017 pour détection moléculaire de la résistance à l'éthambutol (technique : GenoType®MTBDRsl, séquençage *embB* et zone intergénique *embC-embA*)

Gène	EmbB	2015	2016	2017
embB	T215S	1		
	N296H		1	1
	S297A			2
	M306V	32	14	17
	M306I	14	12	17
	M306L			1
	V309F		1	
	Y319C		2	1
	D328Y	1		
	Y334H	2		
	D354A	1	1	3
	E378A			2
	P404S	1		
	G406A		3	3

	G406D ou S	3	1	
	G406C			1
	Q497K	2		1
	Q497R		2	4
	E521A		1	
	W322R + Y334H		1	
	G406A + T212A	1		
	G406D + Q497P			1
	Q497L + T498A + L499P			1
embB et promoteur embB	-16c→T			1
	-8c→A			1
	-12c→t			2
	N296H + -16c→T		1	
	S297A + -16c→T		1	
	Y334H + -12c→T		1	
	G406S + -11c→a + -430g→c		1	
	N296H + -12c→T		1	
	Total mutations	58	44	58
	Pas de mutation	163	126	186
PCR négatives	1	1	10	
Total général	222	171	254	

Bédaquiline

Le séquençage des gènes *Rv0678* et *atpE*, codant pour le régulateur transcriptionnel de la pompe d'efflux MmpL5 et la sous-unité c de l'ATP synthase, est effectué depuis 2017 pour recherche de la résistance à la bédaquiline (cf nouvelles techniques). Il a été effectué **pour 29 souches en 2017**. Des mutations (**Tableau ci-dessous**) ont été détectées chez 1 souche dans *Rv0678* (3,5%).

Distribution des mutations des gènes *Rv0678* et *atpE* dans les souches de *M. tuberculosiscomplex* étudiées au CNR-MyMRA en 2017 pour détection moléculaire de la résistance à la bédaquiline (technique : séquençage *Rv0678* et *atpE*)

Gène	Mutations	2017
<i>Rv0678</i>	L117Q	1
Total mutations		1
Pas de mutation		27
PCR négatives		1
Total général		29

atpE

Total mutations	0
Pas de mutation	28
PCR négatives	1
Total général	29

Linezolid

Le séquençage des gènes *rrl* et *rpIC*, codant pour l'ARN 23S et la protéine ribosomale L3, est effectué depuis 2017 pour recherche de la résistance au linezolid (cf nouvelles techniques). Il a été effectué **pour 78 souches en 2017**. Des mutations (**Tableau ci-dessous**) ont été détectées chez 3 souches (4%).

Distribution des mutations des gènes *rrl* et *rpIC* dans les souches de *M. tuberculosiscomplex* étudiées au CNR-MyMRA en 2017 pour détection moléculaire de la résistance au linezolid (technique : séquençage *rrl* et *rpIC*)

Gène	Mutations	2017
<i>rrl</i>		
Total mutations		0
Pas de mutation		77
PCR négatives		1
Total général		78

<i>rplC</i>	C154R	3
Total mutations		3
Pas de mutation		74
PCR négatives		1
Total général		78

C.2. Mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries non tuberculeuses

249 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2017 ont été soumises à des tests de détection moléculaire rapide de la résistance (+ 12% par rapport à 2016 et + 60% par rapport à 2015).

Les méthodes génotypiques appliquées sont la PCR-séquençage ou l'amplification/hybridation sur bandelette Genotype NTM-DR®.

Espèces à croissance lente (143 souches) :

Détection génotypique de la résistance acquise à la clarithromycine liée à des mutations des nucléotides 2057 à 2059 du gène *rplC* codant l'ARN 23S.

Parmi 138 souches du complexe MAC et 5 souches d'autres espèces à croissance lente, 7 souches portaient une mutation a2057c (*M. avium*, n=1), a2058g (*M. chimaera*, n=1 et *M. intracellulare*, n=2), a2058t (*M. chimaera*, n=2), a2059c (*M. avium*, n=1).

Détection génotypique de la résistance acquise aux aminosides liée à la mutation a1408g du gène *rrs* codant l'ARNr16S.

Parmi 135 souches du complexe MAC et 5 souches d'autres espèces à croissance lente, 2 souches de *M. avium* portaient une mutation.

Espèces à croissance rapide (106 souches)

- **résistance naturelle à la clarithromycine** : présence du gène *erm(41)* séquevar T28 qui confère une résistance inductible difficile à mettre en évidence phénotypiquement (cf. § résistance phénotypique des NTM) chez 58/61 des souches de *M. abscessus subsp. abscessus*, et de 15/15 pour *M. abscessus subsp. bolletii*.

- **résistance acquise à la clarithromycine** par mutation du gène *rplC* codant l'ARN 23S :

- a2058g chez 2 souches de *M. abscessus subsp. abscessus* T28 et 1 souche de *M. abscessus subsp. massiliense* ;
- a2058c chez 1 souche de *M. abscessus subsp. abscessus* T28 et 1 souche de *M. abscessus subsp. masiliense*

- **résistance acquise aux aminosides** par mutation a1408g du gène *rrs* codant l'ARNr16S chez 7 souches : 1 *M. massiliense* et 6 *M. abscessus subsp. abscessus* T28. Parmi ces 6 souches de *M. abscessus subsp. abscessus*, 2 avaient une double mutation dans gène *rplC* et gène *rrs*.

A noter : pas de mutations parmi les 13 souches de *M. chelonae* soumises à la détection génotypique de résistance à la clarithromycine et aminosides.

C.3. Détection de la résistance aux antibiotiques dans les cas de lèpre diagnostiqués en France

En 2017, nous avons reçu 111 biopsies pour 93 patients français ou résidents en France, ce qui montre l'augmentation du recrutement observée depuis le début des années 2010 (~20-30 biopsies /an) suite aux relations établies avec des collègues des départements et territoires d'outremer et des centres hospitaliers de métropole.

L'examen microscopique et la PCR étaient positifs pour 27 des 93 patients, soit 29% (27 biopsies positives sur 111, soit 24%) : 23 nouveaux cas et 4 cas déjà traités dont 2 rechutes et 2 sous traitement.

Ces patients vivaient dans les DOM-TOM (n=18 dont 13 à Mayotte dont 6 venaient des Comores; 5 en Nouvelle Calédonie), ou étaient des migrants résidant en France métropolitaine (total=9 dont 3 de Mayotte, 1 des Comores, 1 du Cap vert, 1 de Guinée-Conakry, 1 de Madagascar, 2 d'Inde).

Les tests moléculaires (gènes *rpoB gyrA, folP*) ont permis de montrer que toutes les souches de *M. leprae* des cas ci-dessus étaient multisensibles, y compris celles isolées des cas déjà traités.

Analyse rétrospective des résultats 2001- 2017 cas de lèpres diagnostiqués en France

Durant les 16 années 2001-2017, nous avons reçu un total de 604 biopsies pour 452 patients suspects de lèpre, dont 244 biopsies positives par examen microscopique et amplification génique (40,4%) ce qui a permis le **diagnostic de lèpre pour 208 patients** (46%) dont 68 en France métropolitaine et 140 dans les DOM-TOM.

Les patients étaient originaires des DOM-TOM (n=123, 59%), d'Afrique (n=65, 31,3%), d'Asie (n=11, 5,3%), d'Amérique (n=3, 1,4 %) ou de France métropolitaine mais ayant voyagé dans des régions d'endémie (n=6, 2,9%).

Parmi les 208 cas, 170 étaient des nouveaux cas (81,7%) et 38 des patients déjà traités (18,3%).

Un antibiogramme moléculaire a été obtenu pour 202 (167 nouveaux cas et 35 rechutes) des 208 cas :

- 185 cas multisensibles
- 17 cas résistants (8,4 %) dont 9 primaires (7 à DDS et 2 aux fluoroquinolones) et 8 secondaires (5 à DDS et 3 à rifampicine). Aucun cas de multirésistance n'a été détecté.

Le taux de résistance était donc en France de 5,1 % parmi les 177 nouveaux cas (R 1aire), et de 22,9% parmi les 35 rechutes (R 2aire). Comme dans la tuberculose, cette différence est très significative (P< 0.01).

La distribution des cas de résistances par lieu de naissance ou de contage présumé (personne née en France mais ayant séjourné longuement en pays endémique, DOM-TOM ou étranger) est présentée dans le tableau ci-dessous.

Les cas résistants observés chez les patients résidant dans les DOM-TOM étaient autant 1aires (n=7) que 2aires (n=8). Par contraste, les 2 seuls cas résistants observés chez les patients nés ou résidant à l'étranger étaient 1aires, en cohérence avec ce qui est observé à travers le programme de surveillance de l'OMS auquel participe notre CNR.

Résistance aux antilépreux chez les patients diagnostiqués en France, synthèse 2001-2017

Lieu de naissance ou contage	Cas avec antibiogramme moléculaire			Dont cas résistants		
	Total	Nouveaux	Rechutes	Primaire	Secondaire	Mutations
DOM-TOM	124*	96	28	7 (6 Dds, 1 Fq**)	8 (5 Dds, 3 Rif****)	<i>folP</i> : P55L (6), T53I (4) T53A (1) <i>rpoB</i> : S456L (2) S456F (1) <i>gyrA</i> : A91V (1)
Etranger	75*	68	7	2 (1 Dds, 1 Fq***)	0	<i>folP</i> : P55L (1) <i>gyrA</i> : A91V (1)

Dds, dapsonne; Rif, rifampicine; Fq, fluoroquinolone

* dont 6 patients nés en France métropolitaine mais ayant séjourné longuement en pays endémique, soit en DOM-TOM (n=1), soit à l'étranger (n=5 : 3 en Afrique, 2 en Asie)

** Nouvelle Calédonie ; *** immigrant du Brésil résidant en France ; **** 2 Martinique, 1 Tahiti

La majorité des mutations de résistance 1aire concernent la dapsonne (gène *folP*, 7 sur 9), ce qui n'est pas étonnant en raison de l'emploi très ancien, autrefois en monothérapie, de cet antilépreux qui a entraîné des rechutes à bacilles résistants et des cas de transmission à partir de ces rechutes. **Cependant il faut noter 2 cas de résistance 1aire aux fluoroquinolones** (gène *gyrA*, 1 de Nouvelle Calédonie ; 1 de migrant du Brésil résidant en France), très probablement liés à l'emploi large de ces antibiotiques dans de nombreux types d'infections (urinaires, respiratoires...).

La majorité des mutations de résistance 2aire concernent la dapsonne mais il faut noter 3 cas de résistance 2aire à la rifampicine (gène *rpoB*) **dans les DOM-TOM** (Martinique, Tahiti) **ce qui suggère des défauts d'organisation des traitements dans ces régions.**

Les différences observées entre les taux de résistance parmi les cas diagnostiqués en France et ceux observés dans les pays d'endémie lépreuse (réseau OMS de surveillance de la résistance aux antilépreux) sont frappantes, **1aire** (7,3% vs 2.9%, $P=0,1$) et **surtout 2aire** (28,6% vs 0%, $P< 0.01$).

Dans les régions qui suivent la stratégie OMS, le traitement de la lèpre est standardisé depuis une trentaine d'années et les antilépreux sont fournis gratuitement sous une forme qui favorise supervision et

compliance. Les taux de résistance 1aire y sont bas et il n'y a pas de résistance 2aire. Par contraste, **dans les DOM-TOM où les patients sont pris en charge par des structures variées et mal coordonnées, les taux de résistance 1aire, et surtout de résistance 2aire, sont très élevés, suggérant des défauts importants d'organisation** dans la prise en charge des patients, en tout cas dans le passé.

2.5. Activités de séquençage génomique (WGS, NGS)

Le CNR a accès à des plateformes de séquençage :

- accès à 4 plateformes: celles des 2 hôpitaux du CNR, celle de GenoScreen (Lille) et celle de l'Institut Pasteur de Paris
- Technologie/matériel : HiSeq, MiSeq, NextSeq selon les plateformes

Le CNR a accès à une expertise bio-informatique (cf ci-dessous). Les analyses bio-informatiques sont menées à l'aide des logiciels Bionumerics et Galaxy.

Le WGS est utilisé en complément d'autres techniques (amplification-séquençage des gènes de résistance pour *M. tuberculosis* et les MNT, MIRU 24 pour la phylogénie de *M. tuberculosis*).

Le séquençage est utilisé à des fins d'investigations de suspicions d'épidémies et de surveillance, pour les cas de tuberculose MDR (toutes les souches MDR sont étudiées) et d'infections iatrogènes à MNT (dans le cadre d'enquêtes menées avec les autorités sanitaires, par exemple *M. chimaera*).

En raison d'une sévère diminution budgétaire, le CNR-MyRMA s'est vu contraint de limiter en 2017 le déploiement du WGS en routine.

2.5.1. WGS et *M. tuberculosis* (laboratoire Pitié-Salpêtrière)

Notre activité en 2017 s'est concentrée sur la mise en place d'une stratégie et d'un workflow permettant l'utilisation du séquençage et de l'analyse des génomes complets de souches MDR dans un contexte de routine :

Développement des moyens en 2017

L'objectif était de mettre en place des outils de routine adaptés pour (a) explorer les variations génomiques, (b) déduire les SNP (single nucleotide polymorphism) impliqués dans la résistance acquise aux antituberculeux, et (c) déduire les relations phylogénétiques existant entre les souches analysées.

a) Formations aux techniques de WGS

- Assemblage des séquences génomiques : FASTQC, CUTADAPT, PRINSEQ, SPADES, BOWTIE2, SAMTOOLS (formation GenoScreen Lille, septembre 2017)
- Workshop "Next Generation Sequencing – BioNumerics" (Applied Maths, Ghent, Belgique, octobre 2017)
- Outils d'analyse GALAXY organisée par A.Lermine dans le cadre du déploiement de la plateforme de bioinformatique SeqOIA de l'APHP (novembre 2017)

b) Mise en place d'un nouveau circuit pour la réalisation du WGS

En plus des services utilisés les années précédentes (plateforme Pitié-Salpêtrière équipée d'un Illumina HiSeq 2000, Plateforme GenoScreen de Lille équipé d'un Illumina Miseq), nous avons mis en place un circuit complémentaire de séquençage via la plateforme de Microbiologie Mutualisés (P2M) de l'Institut Pasteur de Paris (illumina NextSeq 500)

c) Mise en place de l'outil d'analyse GALAXY dans le cadre du déploiement de la plateforme SeqOIA de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (APHP)

Accessible aux utilisateurs de l'APHP depuis octobre 2017, la plateforme SeqOIA est basée sur une structure unique de bio-informatique utilisant une infrastructure de stockage et de calcul hébergée au sein de l'AP-HP, agréée pour l'hébergement des données de santé. Cette plateforme, créée dans le cadre du Plan France Médecine Génomique 2025, permet l'analyse et l'intégration des données du séquençage génomique très haut débit au parcours de soin du patient. Elle s'appuie sur la suite bio-informatique intégrée GALAXY qu'elle met à disposition des utilisateurs pour l'exploitation des résultats WGS selon un processus automatisé.

Après avoir suivi la formation ad hoc (cf supra), nous avons développé un pipeline d'analyse permettant

l'assemblage des données brutes WGS et l'extraction automatique des SNPs pour 22 gènes impliqués dans la résistance aux anti-tuberculeux (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *pro fabG*, *fabG*, *gyrA*, *gyrB*, *pncA*, *ethA*, *ethR*, *embB*, *embA*, *embC*, *rpsL*, *rrs*, *rrl*, *rplC*, *atpE*, *rv0678*, *eis*, *tlyA* et *gidB*).

Ce pipeline a été validé à l'occasion du contrôle qualité européen « Next Generation Sequencing » auquel nous avons participé en 2017 (séquencé de 10 génomes complets) et pour lequel notre score de réussite a été de 100% (cf annexe 1). L'analyse phylogénétique basée sur la comparaison des SNP totaux est quant à elle réalisée avec le logiciel BioNumerics.

Activité de WGS en 2017

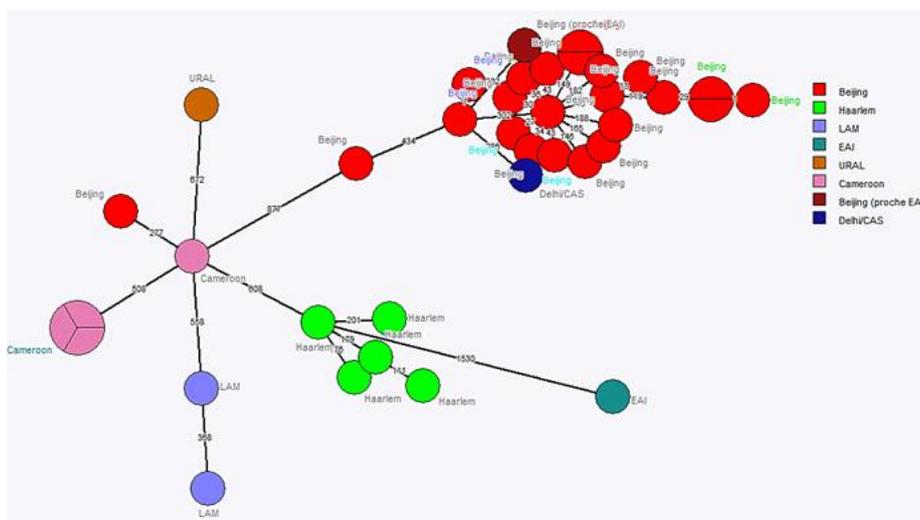
38 génomes de *M. tuberculosis* ont été séquencés en 2017 et analysés dans le cadre de la routine pour détection des SNPs, identification des mutations associées à la résistance, et comparaison des échantillons par analyse phylogénétique. Comme le montre la Figure, nous avons analysé :

- 24 génomes de souches rattachées à la lignée Beijing, parmi lesquels 18 MDR (12 de 2017, 4 de 2016 et 2 de 2015), et 6 non MDR
- 3 génomes de souches Cameroon MDR (analyse réalisée dans le cadre d'une étude européenne transfrontalière)
- 11 génomes de souches non Beijing-non MDR isolées en 2017 et rattachées à différents clades, parmi lesquels 5 Haarlem, 2 LAM, 1 Cameroon, 1 URAL, 1 EAI, 1 Delhi/CAS.

Mutations dans les gènes de résistance des souches

La comparaison des SNP trouvés par WGS et des mutations trouvées lors de nos travaux d'expertise de routine par amplification séquençage de chaque gène de résistance a montré une parfaite corrélation, ce qui montre l'intérêt potentiel du WGS pour identifier le résistome des souches cliniques

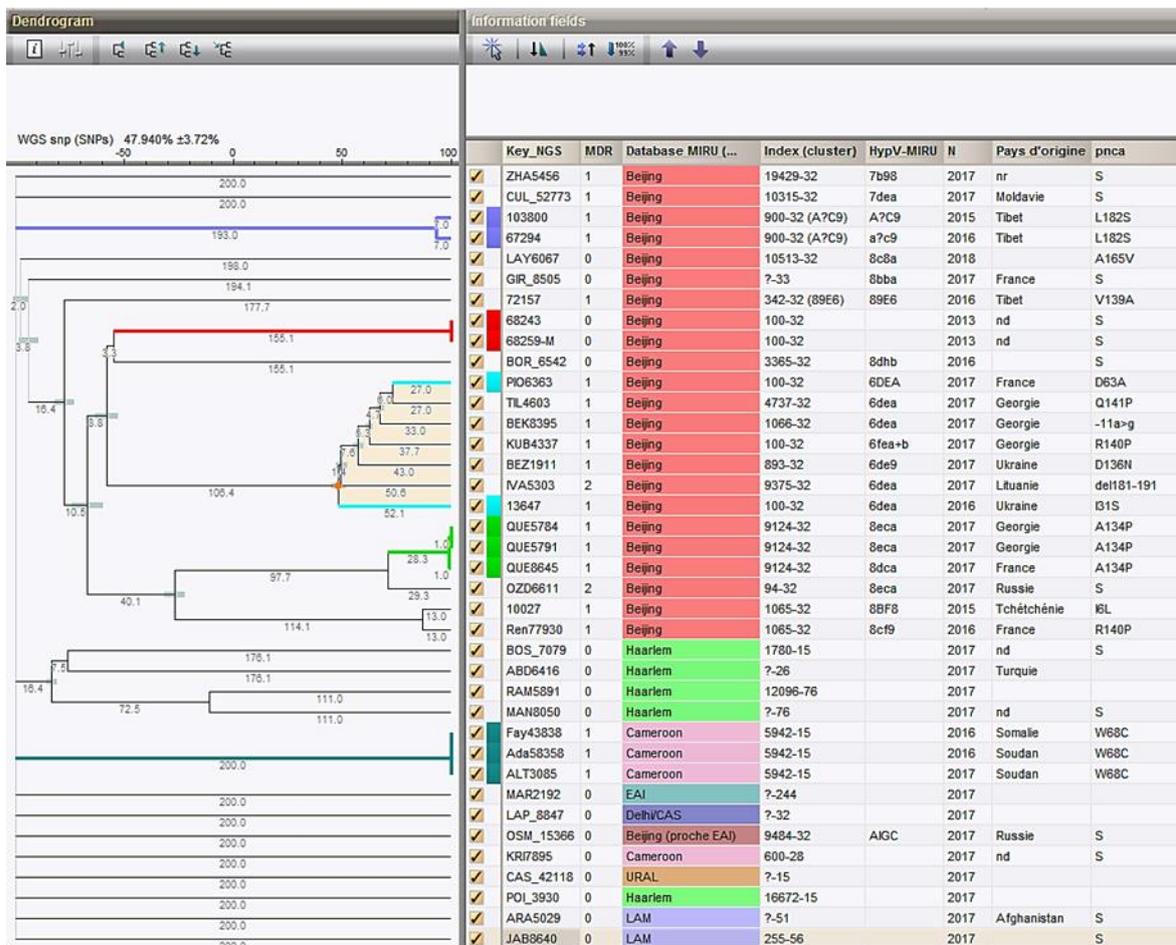
Analyse phylogénétique des souches



Minimum spanning tree obtenu par analyse phylogénétique des 38 génomes de *M.tuberculosis*. Les nombres de SNP sont indiqués sur les branches. Les clades sont indiqués selon un code couleur.

On note que les souches Beijing (en rouge) forment majoritairement un cluster compact dans lequel un nombre significatif de souches sont connectées par des branches de longueur inférieure à 100 SNP, ce qui traduit une divergence récente de ces souches (on considère que la vitesse d'évolution chez *M. tuberculosis* est de 0,5 à 1 SNP/génome/an).

Le dendrogramme de la figure suivante montre de façon plus détaillée les liens établis entre les souches par l'analyse des génomes complets.



Dendrogramme obtenu par analyse phylogénétique (méthode UPGMA) des 38 génomes de *M.tuberculosis*. Le nombre de SNP identifiés entre les groupes de souches reliées est indiqué sur les branches. Les différents clades sont indiqués en couleur (cf légende de la figure précédente).

Analyse détaillée des génomes selon la famille phylogénétique

Famille Beijing (rouge), cluster vert clair (QUES5784, QUES5791 et QUES8645) : 1 souche de type 9124-32 d'un patient (QUES8645) né en France, reliée à 2 souches (QUES5784 et QUES5791) isolées en 2017 chez un patient né en Géorgie. Les 2 souches, non distinguable par phénotype et génotype de résistance, portant une mutation rare dans *pncA* (W68C), ont un lien épidémiologique clairement établi par l'enquête épidémiologique. Ce lien est confirmé par l'analyse WGS puisque la souche du patient QUES8645 présente 1 seul SNP de différence par rapport aux 2 souches QUES5784 et QUES5791 de l'autre patient (la parfaite identité des génomes de ces 2 dernières souches confirme la robustesse de l'approche génomique). Il est intéressant de noter que les 2 patients présentent des « MIRU hypervariable complémentaire » très proches mais non identiques (8dca vs 8eca, soit 3 loci identiques sur 4), résultat inattendu dans le cadre d'une transmission directe confirmée entre 2 patients. Ceci peut être lié à une vitesse d'évolution élevée des MIRU complémentaires hypervariables.

Famille Beijing (rouge), branches bleu clair : 2 souches de type 100-32 avec « MIRU hypervariable complémentaire » identiques (6DEA), isolées l'une en 2016 d'un patient né en Ukraine (souche 13647) et l'autre en 2017 d'un patient né en France (souche PIO6363). Alors qu'on pourrait s'attendre à une transmission directe entre ces 2 patients, l'analyse génomique montre clairement que les 2 souches ne sont pas directement reliées sur le dendrogramme, le point de connexion étant distant de 52 SNP. Ce résultat confirme le pouvoir discriminant insuffisant du MIRU-VNTR pour la lignée Beijing, même lorsque le MIRU complémentaire hypervariable est associé aux 24 loci du MIRU-VNTR, et renforce l'intérêt du WGS comme marqueur moléculaire épidémiologique à haute résolution.

Famille Beijing (rouge), cluster violet : 2 souches de 2 patients originaires du Tibet, isolées en 2015 et 2016. Les 2 souches présentent entre elles seulement 7 SNP de différences, en faveur d'une transmission directe. Ces 2 souches sont non distinguables par leurs phénotypes et génotypes de

résistance, et portent en particulier la mutation rare L182S dans *pncA*.

Famille Beijing (rouge), cluster rouge : 2 souches isolées dans le cadre d'une contamination de laboratoire et incluses dans l'étude comme contrôle « absence de SNP » (vérification de la robustesse du processus de séquençage et d'analyse).

Famille Cameroon (violet), cluster vert foncé : 1 souche isolée en 2017 (ALT3085) d'un patient né au Soudan, indistinguishable par phénotype et génotype de résistance de 2 souches isolées en 2016, d'un patient né en Somalie (Fay43838), et d'un patient né au Soudan (Ada58358). En 2017, nous avons participé à une étude de l'ECDC sur une épidémie de tuberculose multirésistante chez des patients originaires de la Corne de l'Afrique et du Soudan. Les génomes des 2 souches ont été envoyés à Peter M Keller de l'Institute of Medical Microbiology de Zurich qui a supervisé l'analyse des génomes des souches de *M. tuberculosis* de 29 patients MDR de 7 pays européens. Tous les patients provenaient de la Corne de l'Afrique ou du Soudan, et les isolats correspondants, y compris Fay43838 et Ada58358, étaient très proches, la distance variant de 0 à 2 SNP. Cette étude a permis de conclure que l'épidémie était liée à un clone de *M. tuberculosis* circulant dans le nord de la Somalie ou Djibouti, et que la transmission entre les 29 patients identifiés dans 7 pays d'Europe s'est probablement produite au cours de la migration des patients avant leur arrivée en Europe. Ces résultats ont été publiés dans le Lancet Infect Dis. 2018 Apr;18(4):431-440. Walker TM, the MDR-TB Cluster Consortium et al. "A cluster of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among patients arriving in Europe from the Horn of Africa: a molecular epidemiological study.

En conclusion, ces résultats confirment l'intérêt potentiel du séquençage complet des génomes des souches de *M. tuberculosis* MDR en tant qu'outil de typage moléculaire à très haute résolution. Il est important de généraliser l'utilisation en routine de cet outil.

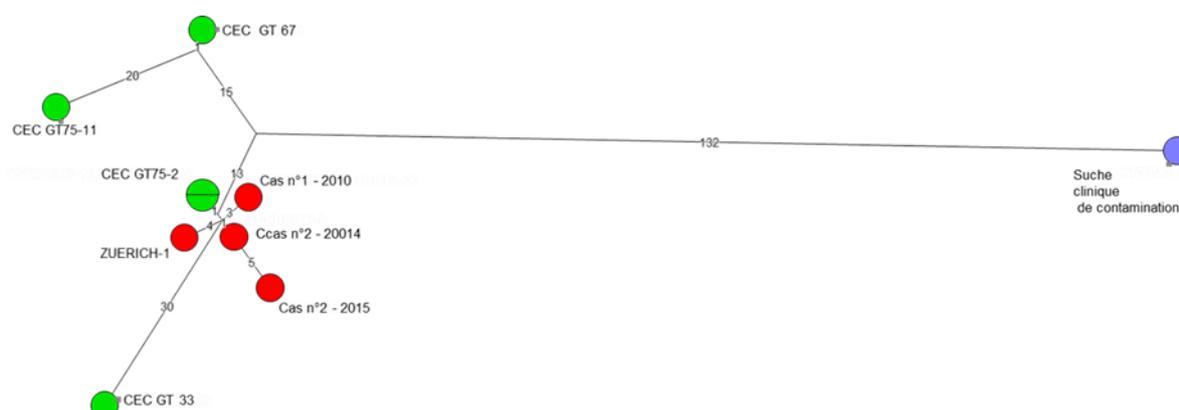
2.5.2. WGS et mycobactéries non tuberculeuses (laboratoire Lariboisière)

Nous avons en 2016 développé le séquençage du génome sur un équipement GS Junior Roche mis à notre disposition. Suite à l'arrêt de la commercialisation de cet équipement, **nous nous sommes tourné en 2017 vers la méthode Illumina sur MiSeq (plateforme Lariboisière) et avons acquis le logiciel Bionumerics.**

Nous avons séquençé 30 génomes de MNT en 2017

La première application a concerné **20 souches de *M. chimaera* dans le cadre de l'épidémie d'infections après CEC** : celles isolées des cas d'infection observées en France, celles isolées de plusieurs générateurs thermiques pour CEC lors d'enquêtes environnementales menées dans les hôpitaux français, et des souches témoin dont celle du 1^{er} cas suisse (Zuerich-1) et une souche indépendante.

Les résultats, présentés ci-dessous (analyse bionumerics) **pour les 10 premières souches** montrent (i) l'identité (1 à 5 SNPs de différence) des souches cliniques françaises et suisses et de certaines souches de générateurs thermiques, (ii) une très forte similitude (10 à 30 SNP) avec d'autres souches de générateurs, mais (iii) plus de 130 SNP de différence avec une souche indépendante (patiente non opérée). Nos résultats ont été confirmés par des échanges d'informations avec l'équipe de Stephan Niemann (Borstel, CNR tuberculose Allemagne) qui avait pris en charge le séquençage des premiers cas européens (suisses, allemands..).



Les 10 autres souches de *M. chimaera*, dont le séquençage WGS a été fait en 2017 mais dont l'analyse est encore en cours, correspondent à des souches isolées de générateurs thermiques dans le cadre d'une étude faite en collaboration avec le service d'Hygiène de l'AP-HP. Ceci permettra de confirmer la similitude des souches isolées de générateurs thermiques et sinon d'étoffer la base de données des génomes de cette espèce émergente. En 2018, l'analyse comprendra aussi les souches isolées lors de l'enquête réalisée en 2017 avec SPF (voir §4).

Nous avons aussi séquencé 10 souches de *M. chelonae* afin de mettre en place les bases de comparaison des génomes de cette espèce très souvent impliquée dans les infections à MNT associées aux soins. Etant donné qu'il n'existe pas de recommandation pour l'étude NGS-WGS pour cette espèce, nous constituons notre base de données en incrémentant avec des souches isolées lors des épidémies des années précédentes (mésothérapies, tatouage, injections, ...). Ceci est fait en parallèle avec le recensement des cas d'infections liées aux soins mené avec SPF (Dr Carbonne, Dr Daniau cf § 4).

3. Activités de surveillance

Surveillance de la résistance 1aire et 2aire à travers le réseau Azay-mycobactérie

- 1674 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016 par 39 CHU (recueil mené en 2017)
- caractéristiques principales des cas : 6,7 % antécédents de traitement ; 5,7 % VIH+ ; 67 % nés à l'étranger, en forte augmentation depuis les années 1990 (35%)
- taux de résistance 1aire (pas d'antécédent de traitement) : 14,5 % à au moins un des 4 antituberculeux de 1ère ligne ; 9,6 % chez les patients nés en France mais 16,6 % chez ceux nés à l'étranger ($p < 0,02$), 6,6 % à l'isoniazide (augmentation régulière significative depuis 1995) ; 1.7 % à la rifampicine
- taux de multirésistance 1aire : 1,9% (double de celui de 2009 et 2010)
- taux de résistance 2aire (antécédents de traitement) en augmentation depuis 20 ans : 18,9% à l'isoniazide (16,7 % en 1995), 13,5 % à la rifampicine (7,9% en 1995)
- La presque totalité des cas de multirésistance 1aire et 2aire concernaient des patients nés à l'étranger
- taux global de multirésistance dans les CHU : 3,7 % (23 cas)
- la quasi-totalité des cas résistants à la rifampicine étaient aussi résistants à l'isoniazide ce qui en fait un bon marqueur de multirésistance.

Surveillance à visée exhaustive de la tuberculose MDR à travers le réseau CNR-MyRMA

- 4221 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016 à travers 187 laboratoires du réseau (recueil mené en 2017), dont plus de la moitié concentrés dans une 20aine de laboratoires (CHU, 2 gros CHG, 2 gros laboratoires privés et 1 laboratoire de sanatorium Ile de France),
- 70 cas MDR en 2016, soit 1,7 % (IC95 : 1,3-2,1%) du total des cas,
- % de cas MDR inférieur à celui calculé sur les cas diagnostiqués par les CHU du réseau Azay-Mycobactéries (3,7%), en raison du caractère spécialisé des services, ce qui montre l'intérêt de travailler avec deux réseaux complémentaires,
- le % de cas MDR a triplé depuis le début de la surveillance en 1992 (0,4-0,7% en 1993-1998),
- la moitié des cas MDR est diagnostiquée en Ile-de-France
- caractéristiques des cas MDR : 62% d'hommes, 78% nés à l'étranger (dont 1/2 en Europe de l'Est), âge médian 34 ans, 7% VIH+, 81 % forme pulmonaire, 49% sans antécédents de traitement
- les caractéristiques des cas MDR se sont beaucoup modifiées depuis 1992 : diminution de 73% à 35% d'antécédents de traitement ; augmentation de 51% à 86% des patients nés à l'étranger (essentiellement Europe de l'est et ex-URSS).

Surveillance de formes particulières de tuberculose

- Tuberculose à *M. bovis* (à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des CHU) : 2,6% des cas de tuberculose ce qui permet d'extrapoler à 60-70 le nombre de cas à *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).

Contribution aux réseaux de surveillance internationaux de la tuberculose

- Les données du réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance 1aire/2aire ont été envoyées à l'ECDC et à l'OMS.
- Les données de génotypage (méthode MIURU et séquençage génome entier) des souches MDR ont été envoyées à l'ECDC pour la surveillance des clusters « transfrontaliers » par le réseau ERLN-TB des CNR européens.

Surveillance de la lèpre en France

- 27 cas de lèpre ont été bactériologiquement confirmés en 2017 par le CNR-MyRMA sur le territoire français : 13 à Mayotte, 5 en Nouvelle Calédonie et 9 en métropole chez des migrants de régions où la lèpre est encore présente.

- Analyse rétrospective des 208 cas de lèpre diagnostiqués au CNR-MyRMA entre 2001 et 2016 : 68 en France métropolitaine (1/2 nés en Afrique et 140 dans les DOM-TOM ; 82% nouveaux cas ; 6% résistants aux sulfamides, 1,5 % à la rifampicine, 1% aux quinolones.

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

Tuberculose non MDR

- le génotypage a permis de confirmer une relation entre les cas dans 20 situations soumises à enquête (total 70 cas) qui comportaient chacune de 2 à 7 cas reliés : 6 fois dans un contexte amical, voisinage, lieu de travail, 5 fois au sein de familles, 1 fois au sein d'une entreprise, 5 fois au sein d'une école, 1 fois dans une prison, 2 fois dans au sein de foyers, 1 fois en milieu de soin.

- les clades (lignées, phylums) dominants étaient : Haarlem (n=6), LAM (n=6), Beijing (n=2), Cameroon (n=3).

Tuberculose MDR

L'analyse détaillée des 25 clusters génotypiques totalisant 40 souches MDR-XDR de 2017, et incluant le résistome, a permis de confirmer un lien bactériologique et épidémiologique pour 4 clusters, totalisant 5 cas MDR de 2017 et 6 cas MDR des années antérieures. Une enquête épidémiologique est actuellement en cours pour 10 autres clusters, totalisant 15 cas MDR de 2017 et 20 cas MDR des années antérieures. Les cas MDR reliés bactériologiquement et épidémiologiquement identifiés en 2017 ont concerné les lignées Beijing et Haarlem.

3.1. Description des réseaux partenaires

Pour une partie de ses activités de surveillance, le CNR-MyRMA s'appuie sur 2 réseaux partenaires :

Le réseau Azay-Mycobactéries

Depuis 1995, le CNR-MyRMA conduit la surveillance annuelle de la **résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux** grâce à 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 publiés qui ont montré que la sensibilité du réseau et la concordance des données avec celles de la DO étaient satisfaisantes.

Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~1.500 cas de tuberculose à culture positive/an.

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, à travers le réseau créé spécifiquement pour cela et qui réunit **l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie (~200 en 2017)**, la surveillance annuelle à visée exhaustive 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*...).

Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~4.000 cas de tuberculose à culture positive/an.

Les informations recueillies à travers ces réseaux sont transmises à Santé Publique France, et constituent une partie des données françaises de l'ECDC et de l'OMS.

3.2. Surveillance de la résistance aux antituberculeux

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

Caractéristiques des cas colligés à travers le réseau Azay-Mycobactéries

Les données recueillies en 2017 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2016 par 39 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries. Comme les dernières années, un laboratoire de CHU de la région Languedoc-Roussillon n'a pas été en mesure de fournir ses données. En revanche le CHU de Grenoble a rejoint le réseau.

Les 39 laboratoires du réseau ont colligé les données concernant 1674 cas de tuberculose à culture positive qu'ils ont diagnostiqués en 2016, soit un nombre de cas stable depuis 10 ans alors que l'incidence de la tuberculose est globalement à la baisse en France.

La distribution des cas par région est donnée dans le Tableau ci-dessous

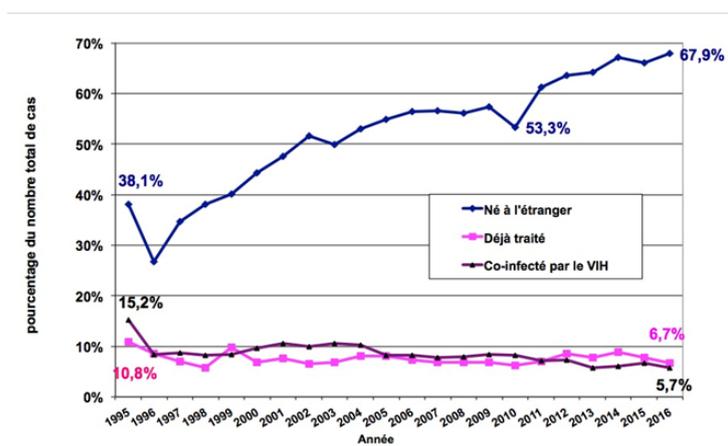
Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 2007 à 2016 : distribution des cas à culture positive selon la nouvelle organisation régionale. Pour 2016, les données sont aussi exprimées en % du total des cas de l'année.

Régions	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
										N	%
Auvergne-Rhône-Alpes	168	164	146	144	144	130	147	158	146	194	11,6
Bourgogne-Franche-Comté	39	46	36	28	32	37	36	55	39	35	2,1
Bretagne	14	22	17	12	15	64	67	58	48	51	3,1
Centre-Val-de-Loire	18	24	15	12	32	22	25	26	26	18	1,1
Corse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grand-Est	69	92	93	75	101	71	79	106	90	112	6,7
Haut-de-France	59	61	66	62	79	60	65	56	72	50	3,0
Ile-de-France	712	712	780	747	773	820	825	783	776	861	51,4
Normandie	66	74	70	70	50	66	77	69	61	71	4,2
Nouvelle-Aquitaine	145	147	163	163	181	140	84	86	101	84	5,0
Occitanie	148	110	86	42	45	52	17	56	58	66	3,9
Provence ACA	37	39	38	61	44	40	50	40	40	53	3,2
Pays-de-Loire	74	79	63	71	85	74	75	77	59	79	4,7
TOTAL	1549	1570	1574	1487	1581	1576	1547	1570	1516	1674	100%

Les proportions des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016 par les laboratoires de CHU du réseau Azay-mycobactéries selon les **antécédents de traitement (6,7% déjà traités)**, le **pays de naissance (67,9% nés à l'étranger)** et le **statut VIH (5,7% de co-infection)** sont données dans la Figure ci-dessous.

L'analyse de l'évolution depuis 1995 montre :

- une **tendance à la baisse (10% à 6,7%)** 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 quasi 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 67,9% en 2016,
- une **tendance à la baisse minime mais qui se confirme, de la proportion des cas diagnostiqués chez les patients VIH+** depuis 1995, mais une **stabilité ces dernières années autour de 6%**. L'impact de l'épidémie du VIH sur l'épidémiologie de la tuberculose reste donc modeste en France.



Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %).
Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2016

Sensibilité aux antituberculeux des cas colligés à travers le réseau Azay-Mycobactéries

La sensibilité à la rifampicine et l'isoniazide a été éprouvée pour 1653 des 1674 cas (99%) de 2016.

Résistance primaire

Pour les 1397 malades **sans antécédent de traitement** (nouveaux cas), le pourcentage global de résistance ("**résistance primaire**") à **au moins un des 4 antituberculeux de première ligne était de 14,5%** en 2016 (Tableau ci-dessous). **Ces données confirment la tendance à la hausse débutée en 2014 (Figure a).**

Le pourcentage de résistance **primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (Tableau ci-dessous, Figure b)** était en 2016, comme toujours, beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 6,6%) et la streptomycine (SM 10,7%) que pour la rifampicine (RMP 1,7%) et l'éthambutol (EMB 1,4%).

Le pourcentage de résistance primaire à l'INH (6,6%) est en baisse par rapport à ceux de 2015 (8,8%) et 2016 (8,0%), mais reste supérieur à celui de 2014 (5,6%). Les cas mono-résistants à l'INH représentent la moitié environ de ces cas.

Comme les années précédentes, la quasi-totalité des souches résistantes à la rifampicine diagnostiquées en 2016 chez les patients sans antécédent de traitement (23/24) étaient aussi résistantes à INH (multirésistance). La seule souche monorésistante à RMP a été isolée chez un patient né à l'étranger.

La proportion de cas **multirésistants « primaires »** mesuré en 2016 dans les CHU au travers le réseau Azay-mycobactéries était de 1,7% (23 cas), identique à 2014 mais plus faible que celles de 2015 (2,4%) et 2016 (2,8%).

Résistance primaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance primaire à au moins un des 4 antituberculeux chez les 416 patients nés en France (**Tableau ci-dessous**) était de 9,6% alors qu'elle était de 16,6% chez les 966 patients nés à l'étranger ($p=0,001$). Pour chaque antituberculeux, le pourcentage de résistance primaire était aussi plus élevé chez les patients nés à l'étranger que chez ceux nés en France.

Parmi les 23 cas MDR « primaires », 5 étaient nés en France (4 séronégatifs pour le VIH et 1 statut inconnu), 18 cas nés à l'étranger (13 séronégatifs pour le VIH, trois séropositifs, et deux avec un statut inconnu).

Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2016 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	1397	100	416	100	966	100	111	100	29	100	79	100
Sensible	1195	85,5	376	90,4	806	83,4	82	73,9	25	86,2	54	68,3

Résistant	202	14,5	40	9,6	160	16,6	29	26,1	4	13,8	25	31,7
dont résistant à au moins :												
SM	148	10,7	33	8,0	114	11,9	20	18,4	3	10,3	17	22,1
INH	92	6,6	16	3,9	75	7,8	21	18,9	4	13,8	17	21,5
RMP	24	1,7	5	1,2	19	2,0	15	13,5	1	3,5	14	17,7
EMB	20	1,4	3	0,7	17	1,8	7	6,4	1	3,5	6	7,8
dont monorésistant à :												
SM	102	7,3	23	5,5	78	8,1	6	5,4	0	-	6	7,6
INH	43	3,1	5	1,2	37	3,8	3	2,7	1	3,5	2	2,5
RMP	1	0,1	0	-	1	0,1	2	1,8	0	-	2	2,5
EMB	3	0,2	0	-	3	0,3	0	-				
dont MDR	23	1,7	5	1,2	18	1,9	13	11,7	1	3,5	12	15,2

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

Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 148 cas et le pays de naissance était inconnu pour 54 cas. Pour 21 souches, les antibiogrammes n'ont pas été réalisés. La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 9 cas et l'éthambutol pour 8 cas.

Résistance secondaire

Chez les 111 patients diagnostiqués en 2016 et ayant déjà reçu un traitement antituberculeux (cas déjà traités), le pourcentage global de résistance (résistance "secondaire" ou "acquise") à au moins un des 4 antituberculeux était de 26,1%, soit près de 2 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas. Ce pourcentage confirme la baisse observée depuis 2014 par rapport au chiffre le plus élevé des 20 ans de surveillance rapporté en 2013 (figure c).

Pris séparément, les pourcentages de résistance "secondaire" à INH (18,9%) et RMP (13,5%) observés en 2016 sont aussi les plus bas depuis 2012 (**Figure c**). De manière générale, la résistance « secondaire » à chacun des quatre antituberculeux pris isolément était rare chez les patients nés en France.

Résistance secondaire et pays de naissance

La quasi totalité (12/13) des cas de tuberculose à bacilles MDR « secondaires » a été diagnostiquée chez des patients nés à l'étranger (**Tableau ci-dessus**). En 2016, 1 seul cas de tuberculose à bacilles MDR a été observé parmi les patients nés en France. Ce patient était séronégatif pour le VIH. Parmi les 12 cas MDR « secondaires » nés à l'étranger, un seul était séropositif pour le VIH.

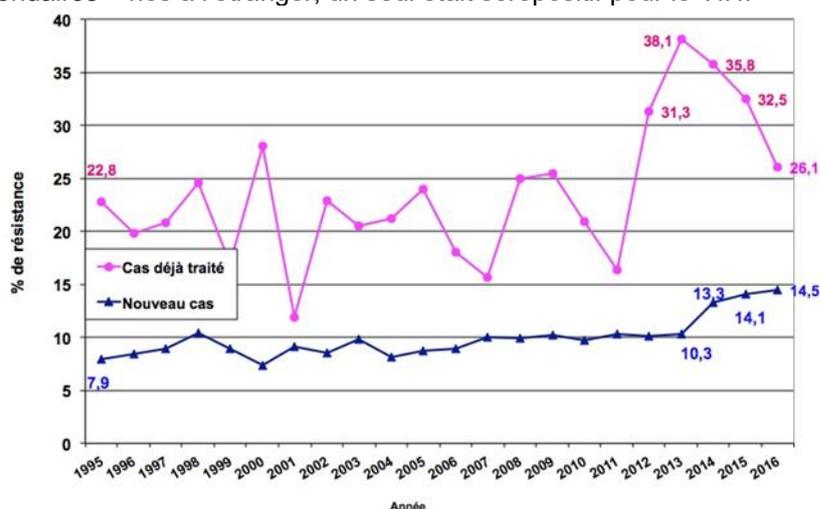


Figure a : Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance « primaire ») et les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2016

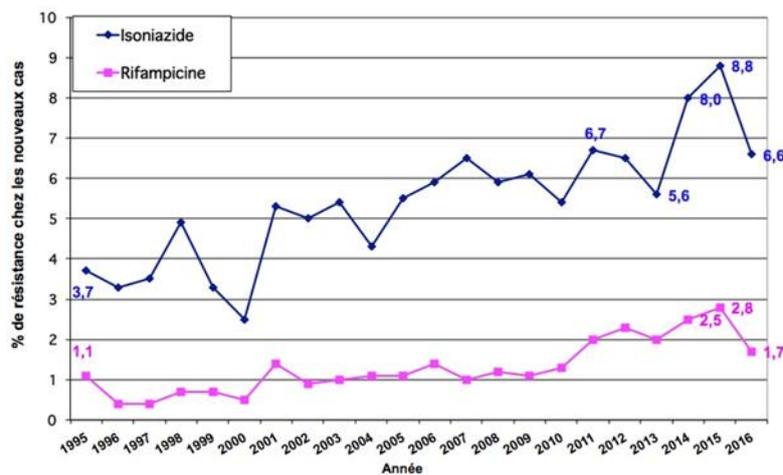


Figure b : Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2016

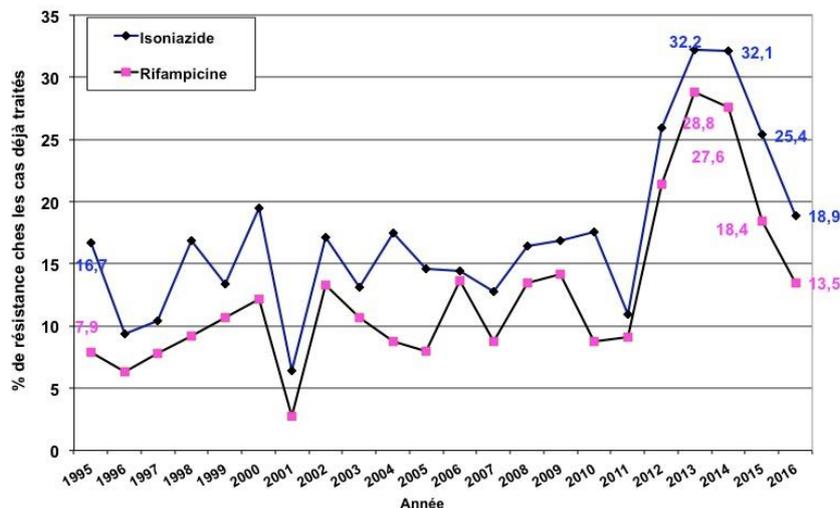


Figure c : Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2016

Monorésistance à la rifampicine

En 2016, deux souches monorésistantes à RMP ont été enregistrées chez deux patients nés à l'étranger et déjà traités (résistance « acquise »), soit 2,5% du total des cas déjà traités. Un était séropositif pour le VIH et l'autre séronégatif. Un cas a aussi été enregistré chez les patients jamais traités. Ce cas était également né à l'étranger et séronégatif pour le VIH.

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

Organisation de la surveillance en 2017

En 2017, le CNR-MyRMA a recueilli des données concernant les cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016, à travers son réseau de laboratoire (réseau CNR-MyRMA). En raison des restructurations des laboratoires d'analyses qui se poursuivent depuis de nombreuses années, le réseau comportait **187 laboratoires** en 2016, soit 10 de moins qu'en 2015. Toutefois, les activités de mycobactériologie des laboratoires ont été transférées dans un laboratoire participant déjà au réseau. Comme chaque année, les données ne sont pas tout à fait complètes au moment de rédiger le rapport d'activité (83% de réponse au questionnaire).

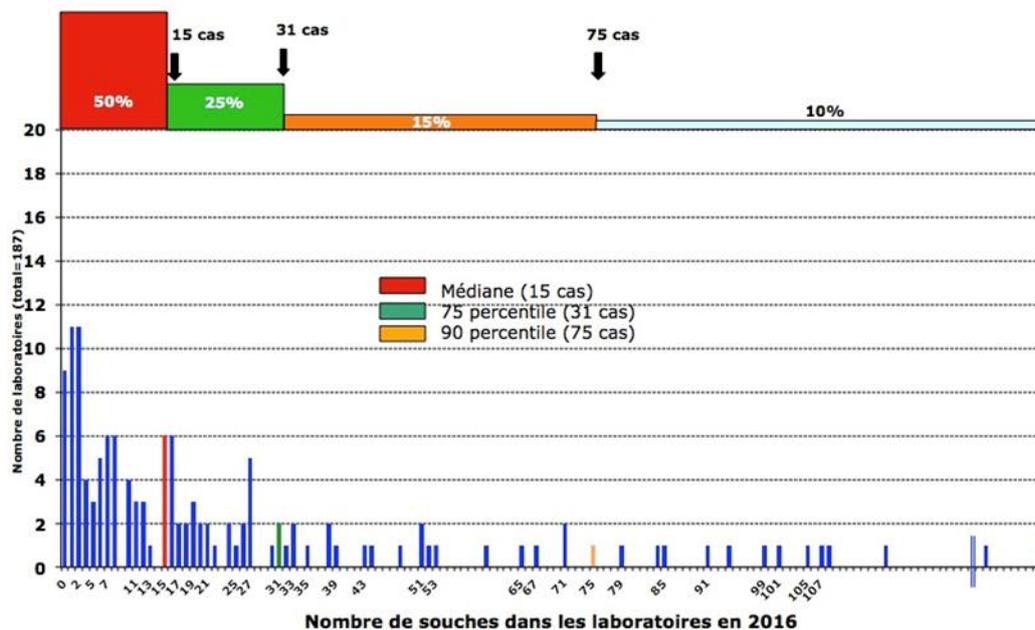
Les données colligées à ce jour **concernent 4221 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016**.

La région Ile-de-France a diagnostiqué un peu moins de la moitié des cas documentés de 2016

(45%) et la région Rhône-Alpes 18%. Ces proportions sont stables par rapport à 2015.

En 2016, les **10 laboratoires dont l'activité est la plus importante** ont diagnostiqué près de la moitié des cas (48%) de tuberculose (Figure ci-dessous) :

- ✓ 7 laboratoires de CHU (3 d'Ile de France et 4 d'autres régions),
- ✓ 1 laboratoire de sanatorium d'Ile de France
- ✓ 2 gros laboratoires privés



Distribution des laboratoires du réseau du CNR-MyRMA en fonction du nombre de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016.

Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants en 2016

Le nombre de **cas de tuberculose à bacilles multirésistants** diagnostiqués en 2016 en France par les 155 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour était de **70**, soit une **proportion de 1,7% (IC95 : 1,3%-2,1%)** de l'ensemble des 4221 cas colligés. **Ce nombre et cette proportion sont en légère baisse par rapport à 2014 et 2015.**

Parmi ces 70 cas MDR, il y avait 1 cas déjà identifié en 2015 (cas à rechutes) et 69 cas diagnostiqués pour la première fois en 2016 en métropole et dans les DOM.

A ces 70 cas, il faut ajouter 3 cas de malades résidant à Papeete et dont les souches ont été reçues au laboratoire du CNR-MyRMA. Ces 3 cas ne sont pas analysés avec l'ensemble des cas de France métropolitaine et des DOM.

Le pourcentage de cas MDR (1,7%) calculé sur les 4221 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par l'ensemble des laboratoires français qui pratiquent la mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) reste significativement ($p < 0,01$) inférieur à celui calculé sur les 1653 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les 39 laboratoires universitaires du réseau Azay-Mycobactéries (2,6% en cumulant les cas de résistance 1aie, 2aie et les cas avec antécédents inconnus ou douteux). Cette différence très probablement liée au caractère spécialisé et de « recours » des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU montre que les CHU concentrent une très grande majorité des cas MDR.

Comme chaque année, quelques laboratoires du réseau CNR-MyRMA n'ont pas encore adressé leurs données 2016 malgré les relances ; toutefois, il est peu probable que le nombre total de cas multirésistants diagnostiqués en France en 2016 augmente avec les réponses de ces derniers laboratoires. En effet, la quasi totalité des nouveaux cas de tuberculose MDR concordent avec les souches MDR reçues par le CNR-MyRMA pour confirmation et antibiogramme complémentaire (cf. plus haut « activités d'expertise »). Un cas correspond à une souche reçue au CNR-MyRMA mais pour laquelle le laboratoire n'a pas encore donné le dénominateur (nombre total de cas à culture positive). La proportion estimée de cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2016 donc est vraisemblablement inférieure à 1,7% si l'on considère les données en attente des laboratoires non déclarant qui ne concerneront très probablement que des cas de tuberculose non MDR.

La proportion de cas multirésistants rapportée au total des cas de tuberculose bactériologiquement prouvés **était comprise entre 0 et 4,5% en 2016** selon les régions (Tableau ci-dessous).

Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2016 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA

Région	Total cas TB	Cas TB MDR	
		N	% du total
Auvergne-Rhône-Alpes	804	8	1,0
Bourgogne-Franche-Comté	50	0	0
Bretagne	104	2	1,9
Centre-Val-de-Loire	69	1	1,4
Corse	1	0	0
Grand-Est	150	5	3,3
Haut-de-France	252	3	1,2
Ile-de-France	1919	31	1,6
Normandie	97	3	3,1
Nouvelle-Aquitaine	188	6	3,2
Occitanie	139	2	1,4
Provence ACA	156	7	4,5
Pays-de-Loire	150	2	1,3
Départements outre mer	142	0	0
Total	4221	70	1,7

Le poids respectif de chaque région parmi les cas de TB-MDR de 2016 est illustré dans le schéma ci-dessous.



Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants de 2016

Les caractéristiques des 69 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2016 en métropole sont les suivantes (n.b. les différences minimes d'effectifs et de distribution par pays de naissance, comparativement à celle des souches MDR reçues au cours de l'année 2016 au Laboratoire du CNR-MyRMA, cf tableau 9, sont dues au fait que quelques souches reçues en 2016 correspondent en fait à des cas diagnostiqués en 2015, et les souches de quelques cas de 2016 ont été reçues au Laboratoire du CNR-MyRMA au début de 2017) :

- 62% étaient des hommes,
- 12 (17,4%) étaient nés en France, et 54 (78,3%) nés à l'étranger,
- parmi les 54 malades nés à l'étranger, 21 étaient nés en Europe de l'Est (dont 3 en Géorgie, 3 en Tchétchénie, 3 en Ukraine, 3 en Russie, et 3 en Roumanie), 19 en Afrique sub-saharienne, 6 au Maghreb, 7 en Asie, et 1 en Amérique du Sud,
- l'âge médian était de 34 ans (1 cas de moins de 5 ans, 5 cas de plus de 65 ans, 14,5% de 15 à 24 ans et 39,1% de 25 à 34 ans),
- 5 (7,3%) étaient séropositifs pour le VIH, 47 (68,1%) étaient séronégatifs et 17 (24,6%) de statut VIH inconnu,

- 81% des cas avaient une atteinte pulmonaire de leur tuberculose,
- 49% n'avaient jamais été traités (MDR « primaire »).

Tendances évolutives 1992-2016

Le pourcentage de cas multirésistants de 2016 confirme la baisse observée en 2015 par rapport à l'année record de 2014 où le pourcentage était le plus élevé depuis le début de la surveillance en 1992. (Tableau ci-dessous).

Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2016)

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	4089	2,3	[1,9-2,8]
2013	82	4267	1,9	[1,6-2,4]
2014	110	4198	2,6	[2,2-3,2]
2015	96	4299	2,2	[1,8-2,7]
2016	70	4221*	1,7*	[1,3-2,1]

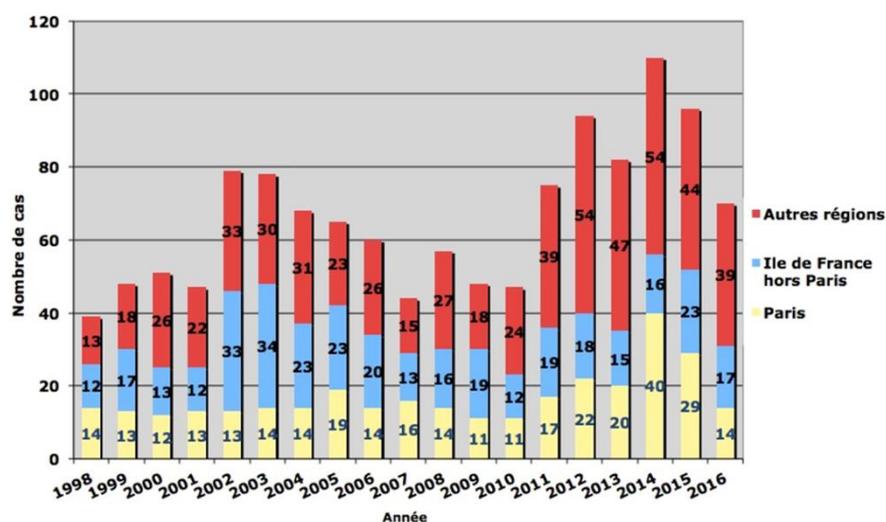
*chiffres à affiner (quelques réponses de laboratoires sont en attente)

La distribution régionale des cas MDR identifiés par le CNR-MyRMA est restée quasi constante dans la majorité des régions durant les années 2008-2016 (Tableau ci-dessous). Il faut cependant noter en 2016 une **diminution notable du nombre de cas dans la région Ile-de-France et dans la région Auvergne-Rhône-Alpes**. La légère diminution dans les régions Rhône Alpes et Provence-Alpes-Côte d'azur en 2015 ne se confirme pas en 2016.

Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2008 à 2016 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA (selon la nouvelle organisation régionale).

Région	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL	% total
Auvergne-Rhône-Alpes	7	5	5	14	11	14	17	11	8	92	13,5
Bourgogne-Franche-Comté	0	0	1	1	2	1	1	0	0	6	0,9
Bretagne	2	3	0	2	5	6	0	2	2	22	3,2
Centre-Val-de-Loire	1	0	0	1	3	1	2	1	1	10	1,5
Corse	3	2	1	0	0	0	1	1	0	8	1,2
Grand-Est	2	1	2	4	5	6	4	4	5	33	4,8
Haut-de-France	2	1	2	1	7	3	6	5	3	30	4,4
Ile de France	31	30	23	36	40	35	56	52	31	334	49,3
Normandie	0	0	4	2	0	2	7	2	3	20	2,9
Nouvelle-Aquitaine	2	2	1	0	7	3	4	8	6	33	4,7
Occitanie	2	1	2	2	5	5	4	4	2	27	4,0
Provence ACA	2	1	4	9	5	4	7	3	7	42	6,2
Pays de Loire	2	2	0	2	3	1	0	3	2	15	2,2
Outre-mer	1	0	2	1	1	1	1	0	0	7	1,0
Total	57	48	47	75	94	82	110	96	70	679	100

Habituellement, l'Ile-de-France cumule un peu plus de la moitié du total des cas MDR mais cette proportion (45%) est notablement plus faible en 2016 (Figure ci-dessous).



Evolution 1998-2016 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.

Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont beaucoup modifiées au cours des 23 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau ci-dessous). 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 (48% à 9%)**. L'augmentation de la proportion de patients nés à l'étranger (de 53% à 90%) était liée aux patients nés en Europe (Europe de l'est et ex-URSS) et en Afrique sub-saharienne.

En **2012-16**, s'est produit, par rapport aux cinq années précédentes, un **retour à une très grande majorité de cas de sexe masculin (72%) et plus de cas nés en Europe (49%)**.

Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 1992 à 2016

Caractéristiques	Périodes				
	1992-1996	1997-2001	2002-2006	2007-2011	2012-2016
N total cas recensés, dont :	215	211	351	275	452
- déjà connus CNR-MyRMA	43 (20%)	38 (18%)	40 (11%)	19 (7%)	10 (2%)
- recensés pour la 1 ^{ère} fois	172 (80%)	173 (82%)	311 (89%)	254 (92%)	442 (98%)
Parmi les cas recensés pour la 1^{ère} fois :					
Age médian	39 (16-88)	36 (3-85)	31 (0-95)	32 (0-82)	34 (0-93)
Sexe masculin	74%	65%	60%	58%	72%
Antécédents de traitement	73%	47%	38%	37%	37%
Atteinte pulmonaire	92%	91%	90%	84%	84%
Né à l'étranger, dont :	51%	65%	79%	83%	86%
- Europe	7%	8%	15%	31%	49%
- Maghreb	15%	19%	13%	7%	6%
- Afrique Sub-saharienne	17%	25%	39%	27%	20%
- Autres	13%	13%	13%	18%	11%
Pays de naissance inconnu	0,5%	3%	3%	8%	1%
Examen microscopique (+)	58%	61%	62%	48%	55%
Résistance à l'éthambutol	33%	30%	35%	53%	62%
Résistance à streptomycine	54%	58%	63%	71%	75%

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

Le CNR-MyRMA effectue depuis 2012 une surveillance de la tuberculose humaine à *M. bovis* à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des laboratoires de CHU.

Ce réseau dispose également des données pour l'année 2011 mais, pour cette année là, les laboratoires n'ont pas contrôlé rétrospectivement que l'information « espèce » était toujours saisie dans la base de données, ce qui a pu aboutir alors à une sous-estimation du nombre de cas. Il faut noter de plus que quelques laboratoires du réseau (n=11/39) n'identifient pas systématiquement 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 à partir de 2013 légèrement inférieur à celui de la surveillance de la résistance aux antituberculeux. Finalement, les chiffres n'incluent pas les cas à « *M. bovis* BCG ».

En 2016, 26 cas de tuberculose à *M. bovis* ont été identifiés par les laboratoires du réseau AZAY, soit 2,1 % des 1241 souches pour lesquelles l'identification a été poursuivie jusqu'à l'espèce : **11 étaient nés en France (âges 7 - 90 ans), 12 au Maghreb (âges 26 - 78 ans), 1 en Afrique sub-saharienne (54 ans), 1 en Europe de l'Est (34 ans) et 1 d'origine inconnue (41 ans). Parmi les 15 cas nés en France, 1 seul était signalé par un CHU d'Ile-de-France, et 6 dans la région Auvergne-Rhône-Alpes.**

La proportion de *M. bovis* parmi l'ensemble des cas de tuberculose est en légère augmentation par rapport aux années précédentes (Tableau ci-dessous). **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* serait de l'ordre de 60-70 par an.** Cette augmentation est liée en 2016 à un plus grand nombre de cas nés en France alors que le nombre de cas nés à l'étranger est stable.

Le CNR participe actuellement avec Santé Publique France à une enquête nationale sur les caractéristiques des cas de tuberculose humaine à *M. bovis* diagnostiqués ces 5 dernières années.

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

Année	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Nombre de cas <i>M. bovis</i>	19	28	10	16	19	26
Nombre de tuberculose à culture+*	1546	1530	1119	1179	1131	1241
Pourcentage de <i>M. bovis</i>	1,2%	1,8%	0,9%	1,4%	1,7%	2,1%
Nombre de laboratoire**	35	37	27	28	28	28

* total des cas pour 2011 et 2012 et à partir de 2013 uniquement les cas de tuberculose pour lesquels l'identification a été poursuivie jusqu'à l'espèce

** total des laboratoires pour 2011 et 2012 et poursuivant systématiquement l'identification jusqu'à l'espèce à partir de 2013

3.4. 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. En raison de la modification de la pratique du BCG en France introduite à la fin des années 1990, cet indicateur est recueilli chaque année depuis 2000 et les données sont ensuite croisées avec celle de Santé publique France pour approcher 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 ci-dessous** donne le nombre de cas de méningite à culture positive selon les années. Les données 2000 à 2011 ont été croisées avec celles de l'InVS. La confrontation des données 2012 à 2016 est en cours.

Alors qu'il y avait une stabilité depuis le début de la surveillance, il **semblait y avoir une légère augmentation du nombre de cas à partir de 2012**. Toutefois, les cas signalés en 2015 n'ont pas été confirmés après enquête détaillée. En 2016, 3 cas ont été signalés et l'enquête est en cours. La modélisation réalisée par l'InVS avant l'arrêt de la vaccination obligatoire avait suggéré une augmentation possible du nombre de cas de méningite dans les 15 ans suivants la modification de stratégie vaccinale. Les données de la surveillance et celles de la modélisation imposent de continuer la surveillance.

Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants ≤ 5 ans de 2000 à 2016.

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
2014	3
2015	0
2016	3

3.5. Surveillance de la lèpre en France

Depuis les actions de motivation menées en 2012-2013 par le CNR-MyRMA auprès des interlocuteurs des DOM-TOM en particulier de Mayotte, département français où la lèpre reste prévalente (~15 cas / 100 000 h), ainsi qu'auprès des dermatologues et infectiologues de métropole, nous avons reçu de nombreuses biopsies pour suspicion de lèpre. Ceci a permis de confirmer le diagnostic **de 131 cas de lèpre entre 2013 et 2017 (27 cas en 2017)**.

Les cas découverts dans les **DOM-TOM représentent 63% du total dont 47% découverts à Mayotte** (cf tableau ci-dessous).

Les 37% restants ont été découverts en métropole chez des migrants venant de pays où la lèpre est prévalente (Inde, Sri Lanka, Pakistan, RDCongo, Mali, Sénégal, Madagascar, Comores, Tchad, Cameroun, Brésil, Haïti...)

	N cas	Nouveaux cas	Rechutes	DOM-TOM (Mayotte)	Métropole**
2013	24	18	6	18 (13)*	6
2014	31	26	5	17 (14)*	14
2015	26	22	4	16 (11)*	10
2016	23	22	1	14 (11)	9
2017	27	23	4	18 (13)	9
Total	131	111	20	83 (62)	48

* Autres DOM-TOM : **2013** : 4 Nouvelle Calédonie, 1 de Guadeloupe ; **2014** : 1 Réunion, 2 Tahiti ; **2015** : 2 Tahiti, 3 Nouvelle Calédonie ; **2016** : 3 Nouvelle Calédonie ; **2017** : 5 Nouvelle Calédonie

** migrants résidant en France métropolitaine

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

En 2017, le CNR-MyRMA a réalisé le génotypage (empreintes digitales génomiques) de 197 souches: 119 souches de *M. tuberculosis* non MDR et 78 souches MDR

La méthode utilisée a été l'analyse MIRU-VNTR de 24 loci pour toutes les souches, complétées si besoin par d'autres loci puis par WGS.

Le contexte épidémiologique des demandes de génotypage de *M. tuberculosis* complex est ci-après classé 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 ARS et les structures de lutte antituberculeuse (CLAT),
- suspicions de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- suspicions de contamination inter-prélèvements au laboratoire,
- études systématiques des souches des cas de tuberculose MDR, ce qui permet de participer au programme Euro-TB de l'ECDC.

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

En 2017, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser le génotypage (empreintes digitales génomiques) de **91 souches de *M. tuberculosis* non MDR** (tableau ci-dessous) en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT.

Il s'agissait de **25 situations de suspicion de transmission en collectivité** (total : 91 cas).

Le génotypage a permis de **confirmer la relation entre les cas dans 20 situations et, au total, pour 70 des 91 cas (77%)**.

Les 20 situations comportaient chacune de 2 à 7 cas bactériologiquement reliés :

- 5 fois au sein d'un établissement scolaire (lycée (x2), collège, école primaire, école maternelle)
- 1 fois au sein d'une entreprise
- 2 fois dans des foyers pour personnes en situation de précarité
- 1 fois au sein d'un établissement carcéral
- 5 fois au sein d'une famille
- 6 fois dans un contexte communautaire (voisinage ou autre contexte).

Parmi ces cas non MDR, aucune situation de suspicion de transmission en milieu hospitalier n'a été identifiée en 2017.

Les lignées phylogéniques en cause étaient surtout les lignées classiques Haarlem (n=22) et LAM (n=19). Peu de lignée Beijing (n=5)

Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* complex non MDR reçues au CNR-MyRMA en 2017, classés selon le contexte épidémiologique

Contexte	Lieu	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement	Lignée
Ecoles	Seine St Denis (collège)	3	3	Haarlem
	Maison Alfort (lycée)	4	3	Cameroon
	Saint Denis (école 1aire)	6	6	LAM
	Anglet - Bayonne (lycée)	11	7 et 3	Delhi/CA et Beijing
	Poitiers (école maternelle)	4	4	LAM
Entreprise	Val d'Oise	2	2	LAM
	Paris	2	0	
Foyers précarité	Paris (foyer migrants)	13	6	Haarlem
	Paris (foyer hébergement d'urgence)	7	6	Haarlem
Prison	Fresnes	5	4	H37Rv
Famille	Brest (couple)	2	2	Cameroon
	Contamine sur Arves (père/fils)	2	2	LAM
	Strasbourg - Toulouse (grand-père/petite fille)	2	2	Haarlem
	Vildé-Guingalan (père/fille)	2	2	nt
	Rennes (mère/fille)	2	2	Haarlem
Communautaire	Strasbourg	2	2	Ural
	Strasbourg	2	0	
	Paris	2	2	Beijing
	Nice	2	0	
	Val-de-Marne	3	2	S
	Lille	2	2	LAM
	St Brieuc	1*	0	
	Strasbourg	5	3 et 2	Haarlem et Cameroon
	Strasbourg	2	Indéterminé [§]	
Strasbourg	3	3	LAM	
Total		91	70	

* souche de 2017 comparée à 2 souches reçues les années précédentes.

§ comparaison de ces 2 souches impossible car un des 2 MIRU-VNTR est resté incomplet après plusieurs essais (seuls 11 loci sur 24 ont amplifié).

Tendances évolutives 2006-2017

Comme le montre le Tableau ci-dessous, le CNR-MyRMA a identifié par génotypage, en complément des enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT et les CCLIN, de 2006 à 2017 :

- 6 à 21 épisodes/an de cas groupés dans les familles et dans la communauté, **soit 180 épisodes en 12 ans totalisant 497 cas (2 à 13 cas par épisode)**.

- 0 à 5 épisodes/an de cas groupés en milieu de soins, soit **29 épisodes en 12 ans totalisant 69 cas (2 à 7 cas par épisode)**.

L'utilisation de méthodes permettant la comparaison des génotypes au cours du temps (RFLP puis MIRU-VNTR 24 loci) est particulièrement importante pour identifier des chaînes de transmission s'étendant sur plusieurs années, comme le montre l'exemple de 13 cas liés identifiés sur une période de 3 ans (2012 à 2014)

Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* non MDR dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques dans les familles et la communauté et en milieu de soin : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2017 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage)

Année	Familles et communauté	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 : 2 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
2015	19 enquêtes (total : 44 cas suspects) 13 épisodes confirmés : Total 26 cas, 1 à 3 cas/épisode À noter : 1 épisode de 1 cas lié à 4 cas de 2010, 1 épisode de 1 cas lié à 3 cas de 2012- 14 ; 1 épisode de 1 cas lié à 1 cas de 2014	5 enquêtes (total 13 cas suspects) 3 épisodes confirmés de 2, 2 et 4 cas liés
2016	27 enquêtes (total : 75 cas suspects) 21 épisodes confirmés : Total 52 cas liés, 2 à 5 cas/épisode À noter : 1 épisode de 2 cas liés à 2 cas de 2014, 1 épisode de 2 cas liés à 2 cas de 2017	3 enquêtes (total 8 cas suspects) 1 épisode confirmé de 2 cas liés
2017	25 enquêtes (total : 91 cas suspects) 20 épisodes confirmés : Total 70 cas liés, 2 à 7 cas/épisode	Aucune enquête

3.6.2. Suspicion de rechute

En 2017, le CNR-MyrMA a reçu **2 souches isolées en 2012 et 2017 chez un patient** suspect de rechute de tuberculose. La rechute a été confirmée par le génotypage.

3.6.3. Suspicion de contamination inter-prélèvements au laboratoire

En 2017, le CNR-MyrMA a reçu **26 souches** correspondant à 8 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. **Le génotypage a confirmé la contamination au laboratoire pour 4 de ces 8 épisodes.** Ces 4 épisodes totalisaient 16 souches dont la moitié était adressée par un même laboratoire.

Tendances évolutives 2006-2017

Comme le montre le tableau ci-dessous, le CNR-MyrMA **a confirmé par génotypage de 2006 à 2017** :
- 0 à 5 cas de rechute par an, soit **17 cas de rechute en 12 ans** sur un total de 28 suspicions (61%),
- 2 à 19 épisodes/an de **contamination inter-prélèvements au laboratoire** soit **101 épisodes en 12 ans** (totalisant 275 cas, 2 à 8 cas par épisode) sur un total de 155 épisodes suspects (65%).

Ces % de confirmation élevés montrent que les indications sont bien posées, ce qui résulte de discussions préalables entre les collègues demandeurs et l'équipe du CNR-MyrMA.

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 2017

Année	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	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
2015	2 suspicions 1 confirmation	6 enquêtes (total: 13 souches) 2 épisodes confirmés : Total 4 cas, 2 cas/épisode
2016	1 suspicion 0 confirmation	5 enquêtes (total: 17 souches) 2 épisodes confirmés : Total 6 cas, 2 et 4 cas/épisode
2017	1 suspicion 1 confirmation	8 enquêtes (total: 26 souches) 4 épisodes confirmés : Total 16 cas, 2 à 8 cas/épisode

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

Nous avons, en 2017, analysé de manière systématique **78 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 génomiques).

Analyse de la répartition des lignées phylogénique des souches MDR

Sur le plan phylogénique (tableau ci-dessous), on voit que la proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing, qui avait plus que doublé entre 2006 (11/57, 19%) et 2013 (41/83, 49%) en relation

avec l'augmentation de la part des cas qui concernait des patients nés en ex-URSS (en particulier en Géorgie), était redescendu à 35% (34/98) en 2015, puis remontée à 44% (30/70) en 2016. **En 2017, la proportion des souches Beijing était de 37%, ce qui confirme la diminution du nombre de cas de tuberculose MDR causés par des souches Beijing depuis 2014.**

Evolution de 2006 à 2017 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignes 1, 2 et 3, et en vert lignée 4)

Années	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	Total
Groupe PGG1													
EAI	2	1	0	0	0	0	2	3				1	9
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	3	4	1	1	1	2	8	21
Beijing	11	9	15	17	19	23	38	41	52	34	30	29	318
West African 2	1	1	0	0	0	0	1	1					4
West African 1	0	0	0	0	0	1				1			2
Canetti	1	0	0	0	0	0							1
Groupe PGG2													
Haarlem et X	5	0	2	2	2	3	2	10	9	10	6	17	68
LAM	5	7	3	3	4	8	16	10	19	22	12	7	116
URAL	4	0	2	1	0	1	2	3	4	2	2	1	22
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	0		1		1	1	1	6
S	2	2	3	1	3	3	3	2	1	2	3	2	27
Cameroon	2	2	3	1	3	1	3				2	2	19
Ghana	4	1	5	6	2	3	1	1	3	4	7	5	42
H37Rv											1	2	3
T1-T2-T3 et « nt »	19	14	18	19	12	19	21	11	18	20	3	3	178
Divers													
NEW-1	0	0	0	0	0	1							1
<i>M. bovis</i>	0	0	0	0	0	1				1	1		3
Total	57	37	51	52	45	67	91	83	110	98	70	78	839

La stratification des cas de TB-MDR 2006-2017 par régions géographiques (figure ci-dessous) montre clairement la prédominance :

- des lignées Haarlem, LAM et L4/nt en France, Maghreb et Afrique de l'ouest et du centre
- des lignées Cameroon et Ural-Tur en Afrique de l'est
- de la lignée Beijing en Russie, Asie centrale (dont Géorgie) et Asie
- de la lignée CAS-Delhi en Asie de l'Est

Répartition (%) des souches MDR 2006-2017 selon les lignées phylogéniques et régions géographiques de naissance des patients

	France	Maghreb	Afriq ouest	Afriq centre	Afrîq est	Europ est	Russie Ukrain	Géorgie	Asie centre	Asie est
N cas MDR-TB	114	38	64	95	23	64	49	140	56	85
EAI	2				9					5
CAS-DELHI	1				4			1		15
Beijing	19	11	9	26	4	22	72	81	84	53
West Afr	1		1							
Haarlem-X	17	32	9	16	9	19		4		
LAM	21	16	5	13	4	6	16	10	9	1
L4/nt	25	29	20	13	13	30	6	3	4	18
Ural-Tur	3				22	12	6	1	4	1
S	2	13			9	6				4
Cameroon	1		3	10	22	1				
Ghana	5		51	10	4					
Uganda				1						
H37Rv	1			8						
bovis	2			1						

Analyse des clusters de souches MDR basée sur l'analyse MIRU-24

L'analyse des **empreintes digitales génomiques** des souches 2017 révèle l'existence de **25 « clusters » pour un total de 40 des 78 souches (51%) partageant des codes MIRU-24 identiques avec des souches de la période 2010-2017.**

Les 25 clusters concernent surtout des souches des lignées Beijing (8 groupes contenant de 2 à 8 souches), LAM (3 groupes de chacun 1 souche de 2017 liée à des souches des années précédentes), Haarlem (5 groupes : 1 de 4 souches, 1 de 2 souches et 3 de chacun 1 souche de 2017 liée à des souches des années précédentes) et Ghana (3 groupes : 1 de 2 souches, et 2 de 1 souche de 2017 liée à des souches des années précédentes). Les 6 autres clusters sont rattachés aux lignées URAL, Ugandall, Cameroon, S, Delhi/CAS, et H37Rv (pour chaque lignée 1 groupe contenant 1 souche de 2017 liée à 1 souche des années précédentes).

La technique **MIRU 24 loci n'étant pas très discriminante pour 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 davantage encore à un lien épidémiologique. **Chaque cluster a donc été analysé en tenant compte** : (a) des caractéristiques des souches (**phénotype et génotype de résistance**), (b) des caractéristiques des patients (**pays de naissance, ville où le diagnostic a été fait, liens familiaux**) et (c) du résultat du **typage complémentaire des souches Beijing par l'analyse de 4 loci supplémentaires dits « hypervariables » que nous avons mis en place en 2015.**

Clusters rattachés à la lignée Beijing

1 cluster (Beijing 100-32) de 8 souches dont :

- 5 souches de type « 100-32/6DEA » de patients originaires de Géorgie (n=4) et de France (n=1), indistinguables par « MIRU hypervariable complémentaire », mais **distinctes** par les phénotypes et génotypes de résistance. Pour 2 de ces patients, l'un né en France et l'autre en Géorgie, les marqueurs génotypiques de résistance sont proches (5 marqueurs identiques sur 6) et proches aussi de 2 autres patients MDR de 2014 nés en Géorgie. Un **possible lien existe donc entre ces 4 patients**. L'enquête épidémiologique est actuellement en cours.
- 3 souches de 3 patients originaires de Géorgie, **distinctes** entre elles et des 5 autres souches par « MIRU hypervariable complémentaire » (100-32/6EEA, 100-32/6DCA, et 100-32/6FEA+B) et par les phénotypes et génotypes de résistance.

Ces 8 souches appartiennent au phylogroupe CC 100-32 de 73 souches reçues au CNR-MyRMA et isolées en France durant la période 2011-2017 de patients majoritairement nés en ex-URSS ou autres pays de l'Europe de l'Est.

1 cluster (Beijing 94-32) de 3 souches dont :

- 2 souches de patients originaires de Géorgie, **indistinguables** entre elles par « MIRU hypervariable complémentaire » (94-32/8DFA) et par les phénotypes et génotypes de résistance. Ces 2 souches de 2017 sont également indistinguables d'une souche isolée en 2014 chez un patient né en Géorgie. Aucun lien épidémiologique n'a été mis en évidence entre le cas de 2014 et les 2 cas de 2017. En revanche, un **lien très probable existe entre les 2 cas de 2017**. L'enquête épidémiologique est en cours pour ces 2 derniers.
- 1 souche d'un patient originaire de Russie, **distincte** des autres par « MIRU hypervariable complémentaire » ((9432-8ECA) et par les phénotypes et génotypes de résistance.

Ces 3 souches appartiennent au phylogroupe CC 94-32 de 75 souches reçues au CNR-MyRMA et isolées en France durant la période 2011-2017 chez des patients majoritairement nés en ex-URSS.

6 clusters contenant 1 souche de 2017, reliée à des souches isolées durant la période 2011-2016 :

- 1 souche d'un patient originaire de Géorgie appartenant au phylogroupe CC 1065-32 de 22 souches isolées de patients majoritairement nés en ex-URSS durant la période 2008-2017. Il est à noter que la souche de 2017 est **indistinguishable** par « MIRU hypervariable complémentaire » (8BF8) de 2 souches isolées en 2015 pour lesquelles le MIRU hypervariable a également été déterminé, mais en est **distincte** par phénotype et génotype de résistance.
- 1 souche d'un patient originaire de Géorgie, reliée au phylogroupe CC 1066-32 de 11 souches isolées durant la période 2007-2017 chez des patients majoritairement nés en ex-URSS. La souche de 2017 est **indistinguishable** par « MIRU hypervariable complémentaire » (6DEA) d'une souche du cluster isolée en 2015 pour laquelle le MIRU hypervariable a également été déterminé, mais en est **distincte** par phénotype et génotype de résistance.
- 1 souche d'un patient né en Géorgie, reliée à un cluster phylogénique (CC 4737-32) de 5 souches isolées en 2013-2017 chez des patients majoritairement nés en ex-URSS. La souche de 2017 est

identique par « MIRU hypervariable complémentaire » (6DEA) mais **distinguable** par phénotype et génotype de résistance d'une souche isolée en 2016 chez un patient originaire de Bulgarie.

- 1 souche de type 10315-32 isolée d'un patient originaire de Moldavie, reliée à une souche isolée en 2011 chez un patient originaire de Roumanie. Les 2 souches sont **distinctes** par phénotype et génotype de résistance.

- 1 souche de type 15009-32 isolée en 2016 et en 2017 d'un même patient originaire de France (**rechute** liée à une interruption prématurée du traitement), **identique** par « MIRU hypervariable complémentaire » (6DEA) et par les phénotypes et génotypes de résistance, à une souche isolée en 2016 chez un patient originaire de Géorgie. Un **lien épidémiologique a été clairement établi** par l'enquête épidémiologique (transmission au travail) réalisée en 2016.

- 1 souche de type 9124-32 d'un patient né en France, reliée à une souche isolée en 2017 chez un patient né en Géorgie. Les 2 souches sont très proches par « MIRU hypervariable complémentaire » (3 loci identiques sur 4) et **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance. Un **lien épidémiologique a été clairement établi** par l'enquête épidémiologique (transmission intrafamiliale).

Clusters rattachés à la lignée LAM

3 clusters contenant 1 souche isolée en 2017, reliée à des souches isolées durant la période 2011-2016

- 1 souche d'un patient originaire d'Algérie, reliée à un cluster phylogénique (5334-51) de 4 souches isolées durant la période 2015-2017. La souche de 2017 est **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance d'une souche isolée en 2013 d'un patient originaire du Maroc et très proche d'une souche isolée en 2016 d'un patient né en France. Un **lien épidémiologique a été établi** pour les cas de 2013 et 2016 (voisinage) et l'enquête est toujours en cours pour le cas de 2017.

- 1 souche (cluster phylogénétique 384-54) d'un patient né en RDC, reliée à 4 souches isolées entre 2008 et 2014 de patients originaires du Congo, de RDC et de Côte d'Ivoire. La souche du patient de 2017 est **indistinguable** de celle d'un patient de 2013 né au Congo. Cependant, **l'enquête épidémiologique n'a pas mis en évidence de lien entre ces 2 patients**. Les 3 autres souches isolées avant 2017 sont **distinctes** par leurs phénotypes et génotypes de résistance.

- 1 souche d'un patient né au Portugal, reliée à un cluster phylogénique (5298-54) de 3 souches isolées entre 2009 et 2014 chez 2 patients originaires du Portugal, et un de France. Les 4 souches sont **distinctes** par phénotype et génotype de résistance.

Clusters de souches Haarlem

1 cluster de 4 souches (Haarlem 190-31)

- 4 souches de patients nés en Polynésie Française, reliées par MIRU à 2 souches isolées en 2015 et 2016 de 2 patients également originaire de Polynésie Française. Un **lien épidémiologique est très probable** (même région, même famille pour 3 de ces 6 cas). L'enquête de terrain est en cours.

1 cluster de 2 souches (Haarlem 3182-15)

- 2 souches de patients nés en France, reliées par MIRU à 3 souches isolées entre 2008 et 2015 de patients nés en France (n=1) et en Roumanie (n=2). Les 3 souches isolées des 3 patients nés en France sont **indistinguables entre elles** par phénotype et génotype de résistance. **Un lien épidémiologique est prouvé pour 2 de ces patients** (transmission intrafamiliale) et l'enquête est toujours en cours pour le 3ème. En revanche, les 2 souches des patients originaires de Roumanie sont **distinctes** par phénotype et génotype de résistance.

3 clusters contenant 1 souche de 2017, reliée à des souches isolées durant la période 2008-2016 :

- 1 souche (cluster phylogénétique 17569-15) d'un patient né au Soudan, reliée à 5 souches isolées entre 2011 et 2015 de patients originaires de République Centrafricaine. La souche de 2017 est **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance de 3 souches isolées en 2015, 2014 et 2013. Un **lien épidémiologique probable** existe entre ces 4 patients. L'enquête épidémiologique est toujours en cours. Les 2 autres souches isolées en 2011 et 2014 sont **distinctes** par leurs phénotypes et génotypes de résistance.

- 1 souche (cluster phylogénétique 18370-15) d'un patient né au Cameroun, **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance de 4 souches isolées de 2 patients originaires de France (cas de 2015), 1 d'Allemagne (cas de 2015), et 1 du Tchad (cas de 2010). Un **lien épidémiologique a clairement été établi entre ces 5 patients** (transmission intrafamiliale).

- 1 souche d'un patient né au Cameroun, **distinguable** par phénotype et génotype de résistance d'une souche isolée en 2016 d'un patient né au Cameroun.

Clusters de souches Ghana

1 cluster de 2 souches (Ghana 67-25)

- 2 souches de 2 patients nés au Mali et en Côte d'Ivoire, reliées par MIRU à un cluster de 15 souches

isolées entre 2008 et 2016 chez des patients originaires de France (n=6), de Côte d'Ivoire (n=8) et du Mali (n=1). Les 2 souches de 2017 sont **distinguable**s par phénotype et génotype de résistance des autres souches du cluster.

2 clusters contenant 1 souche de 2017, reliée à des souches isolées durant la période 2011-2016 :

- 1 souche d'un patient né au Mali, reliée par MIRU à une souche d'un patient originaire de Guinée isolée en 2011, et d'un patient né en Côte d'Ivoire isolée en 2015. La souche de 2017 est **distinguable** par phénotype et génotype de résistance des 2 autres souches.

- 1 souche d'un patient né en Côte d'Ivoire, reliée par MIRU à une souche d'un patient originaire du Cameroun isolée en 2013. Les 2 souches sont **distinguable**s par phénotype et génotype de résistance.

Cluster de souches Cameroon

1 cluster de 1 souche (Cameroon 5942-15)

- 1 souche d'un patient né au Soudan, **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance de 2 souches isolées en 2016, l'une d'un patient né en Somalie, et l'autre d'un patient né au Soudan. Un **lien épidémiologique est possible** entre ces 2 patients. L'enquête épidémiologique est actuellement en cours.

Cluster de souches Uganda

1 cluster de 1 souche (Uganda 463-122)

- 1 souche d'un patient né au Congo, **indistinguable** par MIRU de 2 souches isolées en 2006 de 2 patients nés en RDC, mais pour lesquelles les phénotypes et génotypes de résistance ne sont pas disponibles.

Cluster de souches Ural

1 cluster de 1 souche (URAL 163-15)

- 1 souche d'un patient né en France, reliée à un cluster de 5 souches isolées durant la période 2012-2016 chez des patients originaires de Russie (2012), de Géorgie et d'Ukraine (2013), de Roumanie (2015) et de Moldavie (2016). La souche de 2017 est **indistinguable** par phénotype et génotype de résistance des souches de 2 de ces 5 patients, isolées en 2013 (Ukraine) et en 2015 (Roumanie). Un **lien épidémiologique est possible** entre ces 3 patients. L'enquête épidémiologique est actuellement en cours.

Cluster de souches S

1 cluster de 1 souche (S 11230-15)

- 1 souche d'un patient né en France, reliée à un cluster de 2 souches isolées en 2013 et en 2015 chez 2 patients originaires de Bulgarie. Toutes ces souches sont **indistinguable**s par leurs génotypes et phénotypes de résistance. Un **lien épidémiologique est possible** entre ces 3 patients. L'enquête épidémiologique est actuellement en cours.

Cluster de souches Delhi/CAS

1 cluster de 1 souche (Delhi/CAS 1473-32)

- 1 souche d'un patient né au Pakistan, reliée à un cluster de 4 souches isolées en 2011-2012 chez 2 patients originaires du Pakistan, un patient originaire d'Inde et un patient né en France. Toutes ces souches sont **indistinguable**s par leurs génotypes et phénotypes de résistance. Un **lien épidémiologique est possible** entre ces 5 patients. L'enquête épidémiologique est actuellement en cours.

Cluster de souches H37Rv

1 cluster de 1 souche (H37Rv 641-62)

- 1 souche d'un patient né au Congo Brazzaville, reliée par MIRU à une souche isolée en 2006 chez un patient né en Côte d'Ivoire. Un **lien épidémiologique est possible** entre ces 2 cas mais **la transmission n'a pas pu se faire en France**.

L'analyse détaillée des **25 clusters** génotypiques, totalisant **40 souches** MDR-XDR de 2017, a permis de confirmer un **lien bactériologique et épidémiologique pour 4 clusters, totalisant 5 cas MDR de 2017 et 6 cas MDR des années antérieures**. Une **enquête épidémiologique est actuellement en cours pour 10 autres clusters, totalisant 15 cas MDR de 2017 et 20 cas MDR des années antérieures**.

Les cas MDR reliés bactériologiquement et épidémiologiquement identifiés en 2017 ont concerné les lignées Beijing et Haarlem.

Tendances évolutives 2006-2017

Le Tableau ci-dessous résume les grappes de cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement parmi les souches de *M. tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2017, identifiées par génotypage systématique.

Année	N	Cas reliés* (contexte, pays de naissance)	Lignée
2006	53	1 épisode de 2 cas (famille, Roumanie)	n.d.
2007	38	1 épisode de 4 cas (famille + voisins, Portugal) 1 épisode de 2 cas (famille, Cameroun)	LAM n.d.
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, Viêt-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) [§] 1 épisode de 1 cas (communautaire, RDC)*** [§]	Beijing Beijing Beijing Beijing Beijing S nt LAM
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)** 1 épisode de 2 cas MDR (Foyer, France et Pologne) [§]	LAM Beijing Beijing Beijing EAI LAM URAL nt nt nt nt LAM
2015	98	1 épisode de 2 cas MDR (famille, France) 1 épisode de 6 cas MDR (famille, France) 1 épisode de 2 cas MDR (famille, RDC) [§] 1 épisode de 1 cas MDR (famille et communauté, RDC)*** [§] 1 épisode de 3 cas MDR (famille, travail, Maroc et France) 1 épisode de 1 cas MDR (famille, France et Algérie) [§] 1 épisode de 3 cas MDR (famille, Allemagne, France) 1 épisode de 2 cas MDR (communautaire, Corse)** [§] 1 épisode de 2 cas MDR (famille, communautaire, Brésil-Portugal) [§]	LAM LAM LAM LAM Haarlem Haarlem nt nt nt X
2016	70	1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Mongolie) [§] 1 épisode de 2 cas MDR (lieu de travail, France et Géorgie) 1 épisode de 1 cas MDR (communautaire, France et Ukraine) [§] 1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Tibet) [§] 1 épisode de 1 cas XDR (hôpital, France et Russie) [§] 1 épisode de 2 cas MDR (amis, France) 1 épisode de 1 cas MDR (voisins, France et Maroc) [§] 1 épisode de 1 cas XDR (enquête en cours, France, Portugal et Afrique) [§] 1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Polynésie) [§] 1 épisode de 1 cas MDR (voisins, France et Portugal) [§] 1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Sénégal) [§] 1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Soudan et Somalie) 1 épisode de 1 cas MDR (famille, Albanie) [§]	Beijing Beijing Beijing Beijing Beijing LAM LAM LAM Haarlem X Ghana Cameroun Uganda
2017	78	1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, France et Géorgie) [§] 1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Géorgie) 1 épisode de 1 cas MDR (lieu de travail, France) [§] 1 épisode de 2 cas MDR (famille, France et Géorgie) 1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Algérie) [§] 1 épisode de 4 cas MDR (enquête en cours, famille, France (Polynésie Française)) [§] 1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, famille, France) [§] 1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Soudan) [§] 1 épisode de 1 cas MDR (famille, Cameroun) [§]	Beijing Beijing Beijing Beijing LAM Haarlem Haarlem

1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Soudan) [§]	Haarlem
1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, France) [§]	Cameroon
1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, France) [§]	Ural
1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Pakistan) [§]	S
1 épisode de 1 cas MDR (pas de transmission en France, Congo) [§]	Delhi/CAS

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

** appartient à un même cluster de 13 cas (famille et milieu de travail clos et étroit en Corse) étalés sur 8 ans.

*** appartient au même cluster de 6 cas (famille et communautaire) étalés sur 4 ans.

§ cas lié(s) avec un/des cas des années précédentes

Le nombre de grappes de cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement a augmenté de 1 à 2/an en 2006-2009 à 5 en 2010-12, 7 en 2013, pour atteindre 11 en 2014, avant de diminuer à 9 en 2015, 7 en 2016. En 2017, en attendant les résultats des enquêtes épidémiologiques de 10 grappes de cas, 4 grappes sont déjà confirmées. L'augmentation initiale du nombre de grappes est due (a) à l'augmentation du nombre de cas MDR et (b) à l'accumulation des données sur plusieurs années qui permet l'identification de clusters s'étendant sur plusieurs années. La diminution récente du nombre de cas reliés est principalement due au nombre élevé d'enquêtes épidémiologiques encore en cours ou pour lesquelles le CNR-MyrMA n'a pas eu de retour.

A la différence de 2016 (transmission d'origines variées), la transmission de la maladie parmi les cas reliés est principalement intrafamiliale en 2017 (3 épisodes sur 4) comme pour les années antérieures à 2016.

Les 3 lignées dominantes sont :

- **nt : 11 épisodes, 24 cas**
- **Beijing : 18 épisodes, 33 cas**
- **LAM : 12 épisodes, 30 cas.**

Les autres lignées (URAL, Ghana, Delhi/CAS, EIA, S, X, Uganda) sont rares.

4. Alertes

4.1. Tuberculose

Le CNR-MyrMA a été en contact avec les autorités sanitaires **pour 31 épisodes de cas de tuberculose groupés** pour lesquels les études de génotypage (empreintes digitales génomiques) avaient permis de conclure, en complément des enquêtes de terrain, à des liens bactériologiques et épidémiologiques (cf. **section 3 « Surveillance »**).

Ces 31 épisodes ont fait l'objet de **multiples échanges téléphoniques et de 39 courriers, notamment avec les CLAT correspondants.**

4.2. Mycobactérioses

Endocardites à mycobactéries non tuberculeuses

(articulation avec Santé Publique France, le Ministère de la santé et l'ANSM)

Rappel : de 2011 à 2015, 7 cas d'endocardites à mycobactéries concernant des bio-valves ont été rapportés en France, impliquaient différentes espèces de mycobactéries, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. lentiflavum*, *M. fuerthensis*, *M. wolinskyi* (message d'alerte sanitaire rapide (MARS) 2015). Les investigations n'avaient pas permis d'identifier des sources de contamination liées à la production industrielle de bio-valves et les CCLIN n'avaient pas identifié de réservoir environnemental ni de défaut pouvant expliquer la contamination per-opératoire.

En 2017, nous avons alerté SPF pour une suspicion de 5 cas d'infection de bioprothèses dont 2 positives à *M. chelonae*. Les enquêtes menées avec SPF, le Cpias et l'ANSM sont en cours.

Alerte européenne (ECDC) concernant les infections post-circulation extra-corporelle (CEC) à *M. chimaera*

Après diffusion nationale aux chirurgiens cardiaques, cardiologues, infectiologues et laboratoires de mycobactériologie en 2015, une enquête rétrospective avait permis d'identifier en France deux cas confirmés d'infection post-CEC à *M. chimaera*.

Les souches des 2 cas avaient été comparées en 2016 au CNR-MyRMA par REP-PCR (profils similaires) et envoyées au CNR des mycobactéries en Allemagne (Borstel) pour comparaison aux autres souches européennes (génomme entières quasi-identiques à celui de la souche type de l'épidémie, celle du 1er cas suisse « Zurich1 »). **L'étude par WGS des souches françaises (cas et environnement) a été menée au CNR-MyRMA en 2017 (cf section WGS).**

De nouvelles **recommandations ont été édictées en 2017 conjointement par le CNR-MyRMA**, la DGS et l'ANSM (MARS de mars 2017). **Des interventions aux congrès** de chirurgie cardio-thoracique et vasculaire (SCTV) et des perfusionnistes (Sofraperf) ont été assurées **en juin 2017** (Nice) par le CNR-MyRMA (E. Cambau).

La découverte de *M. chimaera* en Allemagne dans une usine de fabrication des générateurs thermiques (GT) pour CEC explique la proximité génétique des souches isolées des patients et constitue la preuve d'une source commune. De ce fait, les industriels ont recommandé une désinfection du circuit des appareils, un changement régulier de l'eau et la recherche de mycobactéries dans l'eau de ces circuits. C'est pourquoi **le CNR-MyRMA a participé en 2017 à plusieurs réunions de travail sur les protocoles de désinfections et de maintenance des GT**, y compris la surveillance microbiologique de l'eau.

Le CNR-MyRMA a mis au point **un protocole spécifique de recherche de mycobactéries dans les eaux des GT et l'a validé en aveugle en 2017** avec le laboratoire de « Eau de Paris ». Le protocole a été présenté à l'AFNOR et sera mis à disposition sur le site du CNR d'ici peu.

En 2017, le protocole mentionné ci-dessus, a été appliqué au CNR-MyRMA sur 71 prélèvements d'eau de GT des hôpitaux et cliniques pratiquant des CEC : **60% contenaient des mycobactéries** des espèces *M. chelonae*, *M. chimaera* ou *M. mucogenicum*.

Une nouvelle enquête prospective a été menée avec SPF en 2017. Des centres ont été tirés au sort pour pratiquer des analyses microbiologiques de l'eau de GT. Les analyses de cette enquête sont encore en cours.

Infections à mycobactéries non tuberculeuses associées aux soins

En 2017, nous avons entrepris une étude rétrospective systématique des cas d'infections à MNT associées aux soins, avec SPF. Nous avons confronté les signalements e-sin reçus à SPF et les cas rapportés au CNR-MyRMA et ayant fait l'objet d'envoi de souches entre 2012 et 2017. Une cinquantaine de cas ont été répertoriés et sont en cours d'étude.

Nous incluerons les souches de *M. chelonae*, espèce fréquemment impliquée dans les infections à MNT associées aux soins, dans nos travaux de WGS (cf §2)

5. Activités de rétro-information, formation et conseil

5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1. Site internet

Le site <http://cnrmyctb.free.fr> créé en 2006 est régulièrement mis à jour et contient :

- fiche d'information téléchargeable à fournir au CNR-MyRMA pour accompagner les demandes d'expertise bactériologiques (identification, tests de sensibilité aux antibiotiques, génotypage...),
- 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,
- résultats annuels de la surveillance de la tuberculose multirésistante et de la résistance primaire et secondaire,
- publications du CNR-MyRMA,

- mise en ligne des rapports d'activité du CNR-MyRMA, qui précisent les techniques disponibles au CNR-MyRMA
- mise en ligne des diapositives des formations organisées ou co-organisées par le CNR-MyRMA.
- Techniques de mycobactériologie rédigé par le Groupe AZAY-mycobactéries est accessible via le site.

5.1.2. Accueil de stagiaires en 2017

Laboratoire de la Pitié-Salpêtrière

En dehors des thèses et masters, 3 stagiaires pour une durée totale de 21 semaines,

- Bastien HIRTZ, « Etude de l'impact de mutations hors QRDR de GyrA dans la résistance aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* », stage de BTS 2ème année, Paris, 8 semaines
- Bastien MOREAU : 1ère année de BTS bio-analyses et contrôles à l'E.T.S.L. à Paris 13ème : stage de 8 semaines : initiation aux techniques de biologie moléculaire utilisées au laboratoire de routine (bandelettes Line Probe Assay, PCR et séquençage Sanger)
- Jovany MONTEIL, étude des gènes impliqués dans la virulence ou la résistance aux antibiotiques de souches de mycobactéries pathogènes, stage de 2ème année de Licence de Biologie et Ingénierie, Science de la Vie - Université de Cergy-Pontoise, 5 semaines

Laboratoire Lariboisière

En dehors des thèses et masters, 6 stagiaires pour une durée totale de 26 semaines :

- Danielle CHAAYA, Hotel Dieu de Beyrouth, Liban : observation du travail en laboratoire P3 sur les mycobactéries, 1 semaine
- Marianne ANTAR, Université Saint Joseph de Beyrouth, Liban : observation du travail en laboratoire P3 sur les mycobactéries et diagnostic des infections à mycobactéries, 2 semaines
- Célia CARBONNE, Master 1 microbiologie, Université Paris Orsay : identification et résistance aux antibiotiques des mycobactéries du complexe *Mycobacterium fortuitum*, 10 semaines
- Fériel BOUZIANE, Institut Pasteur d'Alger, Faculté des sciences Algérie : suite de la Thèse de sciences sur « l'étude génétique des souches de tuberculose MDR isolées à Alger », 5 semaines
- Meng LU et Yinghe LI, internes médecins de l'université de Pékin : bases du diagnostic des infections à mycobactéries, 4 semaines

5.1.3. Missions en 2017

Missions pour l'ESCMID

- Workshop à l'ECCMID (avril 2017, Vienne)
- Réunion EUCAST, pour la mise en place du comité de l'antibiogramme spécialisé sur les antimycobactériens (avril 2017, Vienne)

Missions pour l'OMS, Programme de lutte contre la lèpre (Emmanuelle Cambau)

- Réunion de rédaction des recommandations pour le diagnostic et le traitement de la lèpre, (Mai 2017, au siège de l'OMS Asie du Sud Est, New Delhi)
- Réunion de rédaction du programme de prophylaxie antilèpreuse associée à la détection autour des cas, avec le « Netherland Leprosy Relief » (Juillet 2017)

Mission pour le réseau « Esther »

- Suivi du diagnostic de la tuberculose dans le laboratoire régional de Moundou et Ndjamen (Tchad) (2017)

Missions pour la Fondation Mérieux (Laurent Raskine)

- Diagnostic bactériologie de la tuberculose et de la lèpre à Tananarive (Madagascar) (Septembre 2017)
- Installation d'un laboratoire de référence des mycobactéries à l'Université Saint Joseph Liban, Beyrouth (2017)

5.1.4. Réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) du Groupe thérapeutique du CNR-MyRMA

Le « **Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile** » organisé par le CNR-MyRMA et dont les activités sont **centrés sur les cas de tuberculose MDR, est doté d'une charte** pour ses réunions qui répondent désormais au label de **Réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP), ou « TB-consilium France »**. La liste des participants présents est établie lors de chaque réunion et une bibliographie à jour est mise à la disposition des participants.

Bilan 2017

Au total **167 dossiers ont été discutés** par le Groupe thérapeutique au cours des **11 réunions de 2017, pour 104 patients**, certains patients ayant fait l'objet de plusieurs présentations pour modification de traitement (**Tableau ci-dessous**)

Il s'agissait de :

- 56 des 82 cas de tuberculose à bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2017. Selon leur complexité, les dossiers de ces cas ont été examinés lors de 1 à 4 réunions,
- 25 des 71 cas de tuberculose à bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2016. Selon leur complexité, les dossiers de ces cas ont été examinés lors de 1 à 2 réunions,
- 9 sujets contact de cas MDR pour discussion de prophylaxie,
- 6 cas MDR-XDR de 2015 (dossiers examinés de 1 à 4 fois),
- 1 cas MDR-XDR de 2014,
- 1 cas de patient présent en France mais pour lequel la souche avait été isolée à l'étranger (Géorgie) et n'était pas disponible. Pour ces cas, qui ne sont pas comptabilisés dans les 71 cas identifiés à partir des souches reçues au CNR, le RCP ne disposait que des résultats papiers émanant des laboratoires étrangers et des données cliniques.
- 12 cas de tuberculose compliquée non MDR,
- 1 cas de mycobactériose compliquée

En 2017, les participants réguliers aux RCP étaient :

- l'équipe du CNR-MyRMA,
- 3 praticiens du Centre Médical de Bligny (Mathilde Jachym, Damien Le Dû, Dhiba Marigot Outtandy),
- 2 pédiatres de l'hôpital Trousseau (Katarina Chadelat, Guillaume Thouvenin),
- 1 pneumologue de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Bertrand Dautzenberg Pitié-Salpêtrière),
- 1 membre du SAMU social de Paris (Bénédicte Rivoire puis Pauline Trebuchet)
- 1 infectiologue de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Valérie Pourcher)
- 1 spécialiste des dosages antibiotiques de l'hôpital Saint-Joseph (Najoua el Helali)
- 1 spécialiste des réactions paradoxales (Anne Bourgarit)

Tendances évolutives 2006-2017

L'activité du « Groupe thérapeutique », a augmenté de 50% de 2009 à 2011, a doublé entre 2011 et 2012, a augmenté de 30% en 2013 et s'est stabilisée depuis 2014 (cf. tableau ci-dessous).

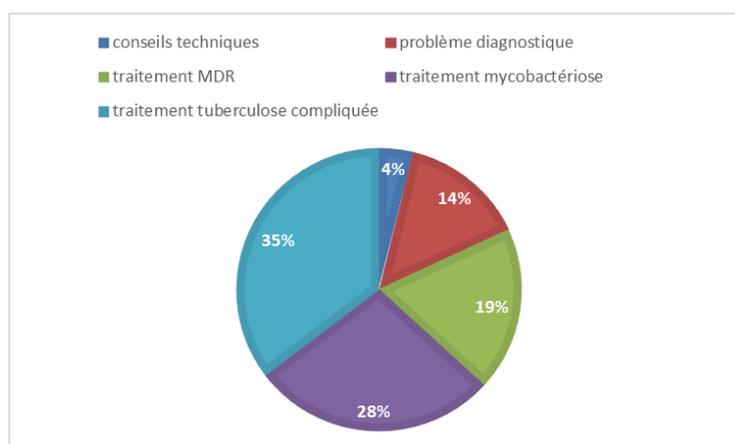
Activités de conseil assurées par le « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » animé par le CNR-MyRMA de 2006 à 2017

	N réunions de travail	N dossiers examinés	Types de dossiers
2006	5	11	- 2 cas XDR 2006 - 9 cas MDR 2006 (dont 1 femme enceinte)
2007	5	13	- 2 cas XDR 2007 - 8 cas MDR 2007 (dont 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) - 27 cas MDR-XDR 2013 - 13 cas MDR-XDR 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
2015	11	160	Les 160 dossiers examinés correspondent à 112 patients : - 51 cas MDR-XDR 2015 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 40 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés de 1 à 4 fois) - 3 cas MDR-XDR 2013 - 10 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France - 4 prophylaxies contacts MDR - 3 cas tuberculoses compliquées non MDR - 1 cas de mycobactériose
2016	11	159	Les 159 dossiers examinés correspondent à 121 patients : - 41 cas MDR-XDR 2016 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 36 cas MDR-XDR 2015 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 22 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés de 1 à 2 fois) - 3 cas MDR-XDR 2013 (dossiers examinés de 1 à 2 fois) - 2 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 9 prophylaxies contacts MDR - 7 cas tuberculoses compliquées non MDR
2017	11	167	Les 167 dossiers examinés correspondent à 104 patients : - 56 cas MDR-XDR 2017 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 25 cas MDR-XDR 2016 (dossiers examinés 1 à 2 fois) - 6 cas MDR-XDR 2015 (dossiers examinés de 1 fois) - 1 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés de 1 fois) - 1 cas pour lequel il n'y a pas de souche disponible en France (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 2 prophylaxies contacts MDR - 12 cas tuberculoses compliquées non MDR - 1 cas de mycobactériose

5.1.5. Activités de « conseil direct » (hors RCP) pour la tuberculose

Des avis ont été donnés en dehors des réunions plénières de RCP, directement lors de **986 appels ou e-mails en 2017**. La durée totale de ces échanges correspond à **1 mois d'équivalent temps plein de médecin**. Les thèmes de ces avis sont présentés dans la **Figure ci-dessous**.



Proportions d'avis « directs » donnés par le CNR-MyRMA en 2017, par téléphone ou par mail, selon le thème abordé.

Au total, que ce soit au travers des réunions plénières des RCP ou de contacts téléphoniques directs, les 4/5 des cas de tuberculose MDR-XDR identifiés en 2017 ont faits l'objet de conseils thérapeutiques par la CNR-MyRMA.

5.1.6. Conseils pour la prise en charge des infections à mycobactéries non tuberculeuses et des cas de lèpre

L'activité de conseil en matière de mycobactérioses est menée en deux temps :

- **lors de la réception de la souche**, afin (i) de s'assurer qu'il s'agit d'une infection et non d'une contamination, (ii) d'identifier les correspondants microbiologiste et clinicien, (iii) de préciser les circonstances de survenue de l'infection (communautaire ou liée aux soins) et (iv) d'apprécier le degré d'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 traitement et d'éventuelles autres actions (chirurgie, arrêt des immunodépresseurs, ablation de matériel infecté, etc....).

Le CNR-MyRMA assure aussi des activités de conseil pour les suspicions de **lèpre** : conditions de prélèvement, diagnostic, traitement et prise en charge.

En 2017, 30 cas d'infection à MNT ont fait l'objet d'une fiche clinico-biologique spécifique pour le diagnostic, le traitement, les enquêtes complémentaires et le suivi ainsi qu'environ 50 cas de suspicion de lèpre.

5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Autorités nationales

Santé Publique France (SPF) et Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM)

- Emmanuelle Cambau, Nicolas Veziris, Vincent Jarlier, Jérôme Robert, Faiza Mougari, Alexandra Aubry et Jérémie Jaffre ont participé le 29 juin 2017 à SPF à une réunion de travail concernant divers points (issues de traitement des TB non MDR, registre des cas TB-MDR, point sur les laboratoires supranationaux).

- Alexandra Aubry, Jérôme Robert et Vincent Jarlier ont rencontré Alexandra Mailles à SPF le 14 novembre 2017 pour mettre en place le questionnaire et l'organisation du travail de l'étudiant en M2 chargé de collecter les données des cas de tuberculoses humaines dues à *M. bovis* ; puis régulièrement échangés par email. Une liste des cas de *M. bovis* recensés au CNR-MyRMA de 2011 à 2017 a été fournie à SPF dans le cadre de ce travail.

- Emmanuelle Cambau, Faiza Mougari, Emmanuel Lecorche, Nicolas Véziris, Vincent Jarlier et Laurent Raskine ont participé, avec SPF, le Ministère de la santé et l'ANSM, aux différentes activités menées suite à l'alerte européenne sur les infections post-circulation extra-corporelle (CEC) à *M. chimaera* (cf section « Alertes ») et au suivi des signalements d'endocardites à mycobactéries non tuberculeuses (janvier 2017, mars 2017, nombreuses réunions téléphoniques).

- Emmanuelle Cambau, Faiza Mougari, Emmanuel Lecorche, Vincent Jarlier, Jérôme Robert ont participé en octobre 2017 à SPF (Anne Carbonne, Come Daniau), à une réunion de travail sur la surveillance des infections liées aux soins à mycobactéries non tuberculeuses

INSERM – AVIESAN (Alliance pour les sciences de la vie et de la santé)

- Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier sont membres du comité de pilotage de « Action Tuberculose » de L'institut Ithématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M) depuis sa création en 2014 : élaboration des programmes des réunions scientifiques annuelles, des listings des équipes françaises impliquées en recherche sur les mycobactéries...

- Wladimir Sougakoff et Emmanuelle Cambau ont organisé avec Patrice Debré (conseiller scientifique de ITMO-I3M) un symposium « NGS for TB : applications et perspectives en diagnostic » dans le cadre de l'Action coordonnée tuberculose (INSERM-IMMI) (17 septembre 2017, INSERM, Paris. L'objectif de la réunion était de suivre les évolutions sur les techniques et l'utilisation du WGS appliqué aux mycobactéries (tuberculose et lèpre)..

AFNOR

- Faiza Mougari et Emmanuelle Cambau ont initié avec l'AFNOR la standardisation de la recherche des mycobactéries dans l'eau.

Autorités internationales

OMS

- Emmanuelle Cambau est membre expert du « Réseau OMS de surveillance de la résistance secondaire aux antilépreux » depuis 2008 et du « Technical Advisory Group » chargé d'élaborer le programme de lutte mondiale contre la lèpre, depuis 2013. En 2017, ce groupe a publié les nouvelles recommandations pour la surveillance de la résistance aux antilépreux (E. Cambau, L. Gillini, M. Matsuoka. A guide for surveillance of antimicrobial resistance under the global leprosy strategy 2016–2020 framework, WHO publication 2017).

- Emmanuelle Cambau est responsable du groupe « Thérapeutique de la lèpre » pour la mandature 2016-2020.

- Emmanuelle Cambau a participé en mai 2017 à New Delhi à la première réunion de guidelines sur le diagnostic, traitement et prévention de la lèpre ("Guidelines Development Group meeting for the development of recommendations on leprosy diagnosis, treatment and prevention"). Les guidelines ont ensuite été finalisées lors de plusieurs réunions téléphoniques et échanges emails. Elles seront publiées en 2018.

- Nicolas Veziris fait partie des experts ERS/OMS pour les conseils de prise en charge des TB MDR en Europe (WHO consilium MDR-TB).

- Alexandra Aubry, Nicolas Veziris et Emmanuelle Cambau ont fait partie en 2017 des experts consultés par l'OMS pour la rédaction des recommandations pour les tests de sensibilité aux antituberculeux de première et de seconde ligne (Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB).

- Jérôme Robert fait partie des investigateurs et membre expert de l'essai multicentrique (coordonné par l'OMS) sur le traitement oral de l'ulcère de Buruli en Afrique de l'ouest (Ghana, Bénin).

ECDC

- Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier sont membres du réseau européen des laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) depuis sa création en 2010 sous l'égide de l'ECDC. Le contrat du réseau ERLN-TB a été renouvelé par l'ECDC pour la période 2014-2018.

- Vincent Jarlier a participé au 8ème workshop de ERLN-TB en mai 2017 à Stockholm (Suède).

- Emmanuelle Cambau a participé en 2017 au suivi du groupe de travail animé par l'ECDC pour répondre à l'alerte européenne sur les infections post-CEC à *M. chimaera*. Une réunion téléphonique a eu lieu en 2017 pour le suivi de l'enquête épidémiologique et microbiologique.

Emmanuelle Cambau fait partie du groupe de relecture des guidelines ECDC pour le diagnostic de la tuberculose en ce qui concerne les recommandations des tests de sensibilité aux antituberculeux.

- Vincent Jarlier est membre du TB-Disease Network Coordination Committee (TB-DNCC).

EMA - EUCAST

- Emmanuelle Cambau est la correspondante de l'EMA (European Agency for Medicine) pour l'expertise bactériologique des nouveaux antituberculeux et la détermination des concentrations critiques (en lien avec l'EUCAST).

- Emmanuelle Cambau est membre expert de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) pour la mise sur le marché et les méthodes de tests de sensibilité concernant les

nouveaux antituberculeux. Elle a été nommée en 2016, responsable du sous-comité pour les mycobactéries (EUCAST subcommittee on antimycobacterial susceptibility testing). Les objectifs sont (1) de mettre en place une méthode standardisée de détermination des CMI, (2) de l'adapter aux principaux antituberculeux y compris les nouvelles molécules (bédaquiline, délamanide...) et (3) mettre au point les tests phénotypiques de sensibilité et génotypique de détection de la résistance.

ESCMID

- Emmanuelle Cambau est Présidente du groupe « European Study Group for Mycobacteria (ESGMYC) », Groupe qu'elle a créé en 2010 au sein de l'European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, (ESCMID). En 2017, elle a cédé son poste de présidente au Prof Delia Goletti (Roma, Italy) et devient past-chair.

- La réunion plénière annuelle de l'ESGMYC s'est tenue durant le congrès de l'ECCMID à Vienna en mai 2017 pour définir les actions à venir. Un « ESCMID workshop » sur le thème « Recommendations and guidelines » a été organisé pendant l'ECCMID.

- Emmanuelle Cambau est co-organisatrice du "Guideline committee for diagnosis and treatment of respiratory infections due to nontuberculous mycobacteria" qui associe à l'ESCMID trois autres sociétés savantes internationales (American Thoracic Society, ATS ; European Respiratory Society, ERS ; Infectious Diseases Society of America, IDSA) pour rédiger des recommandations pour le traitement des infections respiratoires à mycobactéries non tuberculeuses. Les réunions de travail se sont poursuivies par email et téléphone

ISTC

- Emmanuelle Cambau est membre du comité scientifique des projets européens venant des instituts de recherche affiliés à l'International science and technology center (ISTC) des pays de l'ex URSS.

5.3. Conseil et expertise pour d'autres cibles (grand public ...)

Le site <http://cnrmyctb.free.fr> est accessible à tout public

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

6.1. Activités de recherche en cours

Synthèse de nouvelles quinolones

Suite au projet de synthèse de nouvelles fluoroquinolones avec l'équipe de G. Anquetin (Faculté des Sciences, Université Paris 7), au brevet européen (n°EP 14 173 040.8) de 2014, et au brevet international (n° PCT/EP2015/063752) de 2015, et grâce à un financement d'un programme de maturation par la SATT Lutech, nous avons en 2017, identifié une protéine impliquée dans le nouveau mécanisme d'action de ces molécules. Des expériences sont en cours afin de déterminer si cette protéine est la cible ou un activateur. **Pour des raisons de confidentialité, les résultats concernant ces molécules ne seront pas publiés pour le moment.**

Comparaison des milieux MH et 7H9 pour l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques de M. avium complex

Le CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) recommande d'utiliser le milieu de Muller Hinton (MH) tamponné à pH 7,4 pour tester la sensibilité de *M. avium* complex (MAC) aux antibiotiques en microdilution ; or le test de microdilution SLOMYCO® était fourni avec du milieu 7H9 (pH 6,8). Cette différence de pH entre les deux milieux modifie les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la clarithromycine qui est plus active à pH alcalin. Par conséquent les concentrations critiques de la clarithromycine ont été modifiées. En revanche, l'impact sur les CMI des autres antibiotiques n'est pas connu. Nous avons comparé la mesure de la sensibilité aux antibiotiques de MAC avec le test SLOMYCO en milieux MH et 7H9 pour 158 souches de MAC (80 *M. avium*, 40 *M. intracellulare*, 35 *M. chimarea*, 2 *M. yongonense*, 1 *M. timonense*).

La CMI médiane était la même dans les deux milieux pour l'amikacine (16 mg/L), le linézolide (32 mg/L), la rifampicine (4 mg/L) et la moxifloxacine (2 mg/L), mais pas pour la rifabutine ($\leq 0,25$ mg/L en MH et 0,5 mg/L en 7H9), la clarithromycine (2 mg/L en MH, 8 mg/L en 7H9) et l'éthambutol (4 mg/L en MH et 8 mg/L en 7H9). Pour les valeurs de CMIs, le test kappa révélait un accord très faible pour la clarithromycine, l'éthambutol, la rifampicine et la rifabutine ($0 < k < 0,2$), un accord faible pour l'amikacine, la moxifloxacine ($0,2 < k < 0,4$) et un accord modéré pour le linézolide ($0,4 < k < 0,6$). Lorsque les CMIs étaient converties en catégories de sensibilité (SIR), le test Kappa montrait un accord faible pour la moxifloxacine et l'amikacine ($0,2 < k < 0,4$), un accord modéré pour le linézolide ($0,4 < k < 0,6$) et un accord excellent pour la clarithromycine ($k \leq 0,8$).

Comme attendu, la principale différence entre les deux milieux portait sur les résultats des CMI pour la clarithromycine du fait de la différence de pH (6,8 en 7H9 vs 7,4 en MH). Toutefois, le fait qu'il y ait des concentrations critiques adaptées en fonction du milieu a pour conséquence une bonne concordance pour la classification SIR. En revanche, pour les autres antibiotiques, la concordance était mauvaise, ou au mieux, modérée. Ces différences interrogent sur la pertinence clinique de la catégorisation SIR des antibiotiques autres que la clarithromycine pour MAC.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication soumise à Journal of Clinical Microbiology.

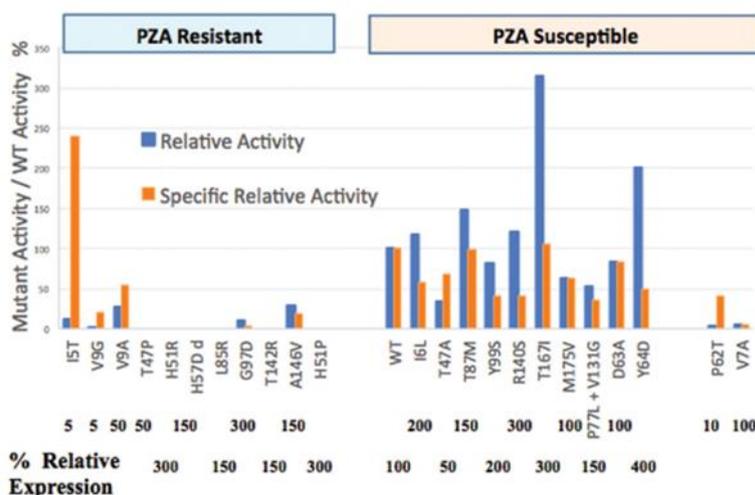
Mesure de l'émergence spontanée de mutants résistants au délamanide dans différentes lignées phylogéniques de *Mycobacterium tuberculosis*

L'objectif principal était d'approfondir les connaissances sur le développement de la résistance au délamanide en mesurant le taux de mutation *in vitro* sur différentes lignées *M. tuberculosis* car les données sur le sujet sont limitées dans la littérature. En 2016, nous avons pu étudier 7 souches de deux lignées différentes, lignées 2 et lignées 4, et, en 2017, nous avons obtenu de nouvelles données sur la lignée 2. En 2016, dans l'étude 1, la très grande quantité de mutants trouvés pour toutes ces souches démontre que la proportion de mutants résistants au délamanide est très élevée, au moins 10^{-6} , peut-être plus pour certaines souches ou lignées. Cette abondance de mutants nous a empêché de calculer le taux de mutation avec notre protocole initial. En s'éloignant du protocole mis en place initialement, nous avons quand même réussi à mesurer un taux de mutation pour les deux dernières souches, Beijing 2 et H37Rv. Le taux de mutation était significativement plus élevé pour la souche H37Rv par rapport à la souche BJ 2 ($1,70 \times 10^{-6}$ vs $6,21 \times 10^{-7}$) et le taux de mutation pour les deux souches était parmi les plus élevés dans la littérature. Nous avons également calculé les proportions de mutants correspondant à ces deux souches et montré que ces proportions étaient élevées ($\geq 10^{-5}$) et supérieures à celles référencées par l'EMA. Nous avons enfin montré que les mutants résistants présentent des niveaux élevés de résistance au délamanide. Les CMI pourraient dépasser 1,6 $\mu\text{g/mL}$, soit plus de cent fois la CMI des souches sensibles. Dans notre étude de 2017 sur la souche Beijing 2, nous avons apporté quelques modifications au protocole qui complétaient ces résultats. Nous avons de nouveau obtenu des proportions élevées de mutants et un taux de mutation de l'ordre de 10^{-7} sur la souche BJ sélectionnée par délamanide. Le niveau de résistance était également élevé. Notre étude de 2017 sur la souche BJ 2 sélectionnée par la rifampicine a montré que la rifampicine avait un taux de mutation très inférieur à celui du délamanide (de l'ordre de 10^{-9}).

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

L'analyse du gène *pncA* par séquençage à partir de souches cliniques résistantes de *M. tuberculosis* dans le cadre de la recherche de la résistance au pyrazinamide (PZA) a montré qu'il existe une très grande diversité de mutations dans ce gène. 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 PZA. Les résultats préliminaires obtenus en 2014 indiquaient clairement que certaines des mutations trouvées dans le gène *pncA* ne sont pas associées à la résistance phénotypique, constituant de potentiels « faux-positifs » pour la détection moléculaire de la résistance au PZA. A partir de ces données, nous avons entrepris le développement d'une nouvelle approche visant à permettre une détection rapide de la résistance au PZA sur la base de la détection directe de l'activité pyrazinamidase PncA (protéine bactérienne activatrice du PZA) dans les souches cliniques. Cette approche, qui a été décrite en détail dans notre rapport de l'année 2016, repose sur la combinaison (a) de l'amplification par PCR du gène *pncA*, (b) d'un système d'expression *in vitro* de la protéine PncA à partir de ce gène et (c) de la mesure quantitative à haute sensibilité de l'activité relative pyrazinamidase et de l'activité spécifique relative par un test colorimétrique à partir des protéines exprimées *in vitro* (Figure).

Relative and Specific Relative Activity



Activité relative pyrazinamidase et activité spécificité relative de différents mutants de PncA. PZA Resistant et PZA Sensible indiquent que les mutants ont été identifiés à partir d'isolats résistants ou sensibles au pyrazinamide. La partie inférieure de la figure montre également l'expression relative de chaque protéine mutante par rapport à l'enzyme sauvage

Parmi les 11 mutants PncA exprimés à partir d'isolats cliniques résistants au PZA, 9 ont été exprimés *in vitro* avec des rendements > 50% par rapport à l'enzyme de type sauvage. Parmi eux, 6 enzymes (T47P, H51P, H51R, H57D, L85R et T142R) n'avaient aucune activité PZase détectable, tandis que les activités relatives pour les 3 autres mutants, V9A (27%), G97D (10%) et A146V (28%) étaient faibles par rapport à l'enzyme sauvage. Les deux mutants restants, I5T et V9G, avaient une activité PZase relative très faible (5%).

Douze autres mutants ont été exprimés à partir d'isolats sensibles au PZA. Leur niveau d'expression *in vitro* était similaire à l'enzyme de type sauvage. Les 12 mutants avaient une active pyrazinamidase élevée avec des activités relatives spécifiques variant de 34 à 314%.

Des résultats discordants ont été observés pour deux mutants, V7A et P62T (mutants très peu actifs identifiés à partir de souches sensibles au PZA).

En conclusion, cette étude a fourni la preuve de concept qu'un test basé sur une PCR réalisée à partir d'isolats cliniques et une synthèse de pyrazinamidase *in vitro* représente une approche rapide pour l'évaluation de la sensibilité au PZA basée sur l'estimation de l'activité PZase relative.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication parue en janvier 2018 dans la revue International Journal of Mycobacteriology

6.2. Publications et communications

Publications Internationales

1. N. Veziris, C. Bernard, L. Guglielmetti, D. Le Dù, D. Marigot-Outtandy, M. Jaspard, E. Caumes, I. Lerat, C. Rioux, Y. Yazdanpanah, A. Tiotiu, N. Lemaitre, F. Brossier, V. Jarlier, J. Robert, W. Sougakoff, A. Aubry. Rapid emergence of *Mycobacterium tuberculosis* bedaquiline resistance: lessons not to repeat past errors. *European Respiratory Journal*. 2017 Mar 22;49(3). pii: 1601719.
2. T. Maitre, G. PetitJean, A. Chauffour, C. Bernard, N. El Helali, V. Jarlier, F. Reibel, P. Chavanet, A. Aubry, N. Veziris. Are moxifloxacin and levofloxacin equally effective to treat XDR tuberculosis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017 2017 Aug 1;72(8):2326-2333
3. E. Lecorche, S. Haenn, F. Mougari; et al. Comparison of methods available for the identification of *Mycobacterium chimaera*. *Clinical microbiology and infection* Epub 2017 Aug 4
4. Guglielmetti L. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: another missed opportunity ? *Eur Respir J* 2017 :49. (editorial)
5. Guglielmetti L, Hewison C, Avaliani Z, Hughes J, Kiria N, Lomtadze N, Ndjeka N, Setkina S, Shabangu A, Sikhondze W, et al. 2017. Examples of bedaquiline introduction for the management of multidrug-resistant tuberculosis in five countries. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2017, 21, 167–174.
6. Mougari F, Loiseau J, Veziris N, Bernard C, Bercot B, Sougakoff W, Jarlier V, Raskine L, Cambau E; French National Reference Center for Mycobacteria. Evaluation of the new GenoType NTM-DR kit for the molecular detection of antimicrobial resistance in non-tuberculous mycobacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Jun 1;72(6):1669-1677.

7. Appelgren A, Morquin D, Dufour S, Le Moing V, Reynes J, Lotthé A, Parer S, Corbeau C, Aubry A, Sougakoff W, Solassol J, Bonzon L, Dumont Y, Godreuil S. 2017. Investigation of a pre-XDR Beijing *Mycobacterium tuberculosis* transmission to a healthcare worker in France. *J Hosp Infect.* 2017 Jun 29. pii: S0195-6701(17)30377-8.
8. Maitre T, Aubry A, Veziris N. Molecular Drug-Susceptibility Test for Tuberculosis. *N Engl J Med.* 2017 Dec 14;377(24):2403-4.
9. D'Ambrosio L, Bothamley G, Caminero Luna JA, Duarte R, Guglielmetti L, Muñoz Torrico M, Payen MC, Saavedra Herrera N, Salazar Lezama MA, Skrahina A, Tadolini M, Tiberi S, Veziris N, Migliori GB. Team approach to manage difficult-to-treat TB cases: Experiences in Europe and beyond. *Pulmonology.* Epub 2017 Dec 8.
10. Fournier A, Bernard C, Sougakoff W, Quelet S, Antoun F, Charlois-Ou C, Dormant I, Dufour MO, Hocine N, Jarlier V, Veziris N. Neither genotyping nor contact tracing allow correct understanding of multidrug-resistant tuberculosis transmission. *Eur Respir J.* 2017 Sep 11;50(3). pii: 1700891.
11. Jaspard M, Elefant-Amoura E, Melonio I, De Montgolfier I, Veziris N, Caumes E. Bedaquiline and Linezolid for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Pregnant Woman. *Emerg Infect Dis.* 2017 Oct;23(10).
12. van Leth F, Günther G, Hoffmann H, Lange C; European MDR-TB Database Collaboration. Reply: Benefit of the Shorter Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimen in California and Modified Eligibility Criteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Dec 1;196(11):1489-1490.
13. Guglielmetti L, Jaspard M, Le Dû D, Lachâtre M, Marigot-Outtandy D, Bernard C, Veziris N, Robert J, Yazdanpanah Y, Caumes E, Fréchet-Jachym M; French MDR-TB Management Group. Long-term outcome and safety of prolonged bedaquiline treatment for multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J.* 2017 Mar 22;49(3).
14. Brossier F, Pham A, Bernard C, Aubry A, Jarlier V, Veziris N, Sougakoff W; CNR-MyRMA. Molecular Investigation of Resistance to Second-Line Injectable Drugs in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Jan 24;61(2). pii: e01299-16.
15. Mougari F, Bouziane F, Crockett F, Nessar R, Chau F, Veziris N, Sapriel G, Raskine L, Cambau E. Selection of Resistance to Clarithromycin in *Mycobacterium abscessus* Subspecies. *Antimicrob Agents Chemother.* January 2017 Volume 61 Issue 1 e00943-16.
16. Guglielmetti L, Veziris N, Aubry A, Brossier F, Bernard C, Sougakoff W, Jarlier V, Robert J. Risk factors for extensively drug resistance in multidrug-resistant tuberculosis cases: a case-case study. *Int J Tuberc Lung Dis,* 2017, <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0387>
17. Rueda D, Bernard C, Gony L, Capton E, Boudjelloul R, Brossier F, Veziris N, Zimic M, Sougakoff W. Estimation of pyrazinamidase activity using a cell-free in vitro synthesis of PncA and its association with pyrazinamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mycobacteriol,* 2018, 7(1):16-25.
18. Leyer C, Gregorowicz G, Mougari F, Raskine L, Cambau E, de Briel D. Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacteria from Solid and Liquid Culture Media. *J Clin Microbiol,* 2017, 55, 2045-2054.
19. Delafont V, Samba-Louaka A, Cambau E, Bouchon D, Moulin L, Héchard Y. *Mycobacterium llatzerense*, a waterborne Mycobacterium, that resists phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*. *Sci Rep,* 2017, 7, 46270.
20. Wyplosz B, Mougari F, Al Rawi M, Baillon C; Marigot-Outtandy D, Le Dû D, Jachym M, Hervé V, Raskine L, Cambau E. Visualizing viable *Mycobacterium tuberculosis* in sputum to monitor isolation measures. *J Infect,* 2017, 74, 207-210.
21. Schön, T ; Miotto, P ; Köser, CU ; Viveiros, M ; Böttger, E ; Cambau, E , *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin Microbiol Infect,* 2017, 23, 154-160
22. Andre, E ; Goeminne, L ; Cabibbe, A ; Beckert, P ; Kabamba Mukadi, B ; Mathys, V & al , Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpmB* gene mutations in pathogenic mycobacteria., *Clin Microbiol Infect,* 2017, 23, 167-172
23. Allerberger, F ; Cambau, E ; Lange, C , Joint efforts urgently needed at times of emerging tuberculosis drug resistance., *Clin Microbiol Infect,* 2017, 23, 129-130

Publications nationales

1. Brossier F, Sougakoff W; French National Reference Center for Mycobacteria(b). Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Mal Infect.* 2017 Jun 17. pii: S0399-077X(17)30608-X.
2. CNR des Mycobactéries, J. Robert. Résistance aux antituberculeux en France en 2014-2015. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 2017 ;7 :127-128.
3. Bouchet F, Martin B, Aubry A, Veziris N, Lavigne JP, Sotto A. Should single antibiotic therapy be avoided for nontuberculous mycobacteria? *Med Mal Infect.* 2017 Dec;47(8):566-568.
4. Maitre T, Aubry A, Jarlier V, Robert J, Veziris N; CNR-MyRMA. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis. *Med Mal Infect.* 2017 Feb;47(1):3-10.

Chapitres d'ouvrage

1. Aubry, F. Mougari, F. Reibel, E. Cambau. Chapitre *Mycobacterium marinum*, in "Tuberculosis", 7th edition, David Schlossberg ed., McGraw-Hill Professional Medical Publishing Division. 2017 & *Microbiol Spectr.* 2017 Apr;5(2).
2. Fraisse P., Veziris N. 2017. Tuberculose pulmonaire et infection tuberculeuse latente. *La Pneumologie Fondée sur des Preuves*, Editions Margaux Orange.

Communications internationales (sans invitation)

1. F. Brossier, N. Veziris, V. Jarlier, J. Robert, W. Sougakoff, A. Aubry on behalf of the French National Reference Center for Mycobacteria. Ability of genotypic methods to diagnose the level of isoniazid resistance among multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB). 48th Union World Conference on Lung Health. 2017
2. E. Lafeuille, F. Devriese, S. Jauréguiberry, E. Fourniols, A. Aubry, on behalf of the PIOS (Pitié-salpêtrière Infection OSteo-articulaire) group. Molecular Diagnosis of Osteo-Arcular Infecons : Preliminary Results of an Evaluaon of the Unyvero ITI G2 Cartridge. ASM Microbes 2017
3. F. Brossier, N. Veziris, V. Jarlier, J. Robert, W. Sougakoff, A. Aubry on behalf of the French National Reference Center for Mycobacteria. Genotypic and Phenotypic Diagnosis of the Level of Isoniazid Resistance in Muldrug-resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: a eight-year experience in France. ASM Microbes 2017
4. L. Guglielmetti, W. Sougakoff, T. Maitre, F. Brossier, V. Jarlier, J. Robert, N. Veziris, A. Aubry. Eligibility assessment for shortened MDR-TB treatment with commercially-available rapid molecular tests. 48th Union World Conference on Lung Health. 2017
5. Lerolle N, Laani M, Galicier L, Rivière S, Fardet L, Meynard J-L, Jebbloui A, Lalande V, Mougari F, Coppo P, Molina J-M, Lambotte O. Tuberculosis-associated hemophagocytic syndrome occurs mostly in immunocompromised patients with disseminated infections. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2017
6. Benmansour H, Mougari F, Antoun F, Micaelo M, Charlois C, , Amarsy R, Raskine L, Cambau E. Analysis of QuantiFERON-TB Gold results obtained in routine for the diagnosis of tuberculosis infection. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2017
7. Lecorche E, Mougari F, Haen S, Raskine L, Moulin L, Cambau E. Comparison of methods available in clinical microbiological laboratories to identify *Mycobacterium chimaera*. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2017
8. Delafont V, Samba-Louaka A, Cambau E, Bouchon D, Moulin L, Héchard Y. *Mycobacterium llutzerense*, a new amoebae resisting bacteria found in drinking water. 17eme congrès Free Living Ameoba, Tunisie 2017.

Communications nationales (sans invitation)

1. Chauffour-Nejevans, F. Mougari, E. Lecorche, F. Reibel, L. Raskine, A. Aubry, V. Jarlier, E. Cambau. Diagnostic bactériologique de la lèpre en France. Journées Nationales d'Infectiologie. 2017.
2. E. Lafeuille, F. Devriese, E. Fourniols, S. Jauréguiberry, A. Aubry pour le groupe PIOS (Pitié-Salpêtrière Infection OStéo-articulaire). Evaluation des performances du test moléculaire multiplex ITI G2 (V2) dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires (IOA). 3è Congrès des CRIOAC. 2017
3. R. Calin, A. Fekkar, D. Boutolleau, A. Aubry, G. Carcelain, S. Boussoar, J. Turret, H. Junot, J. Mayaux, V. Pourcher. Bilan a 18 mois d'une rcp « infection et immunodepression. 18èmes Journées Nationales d'Infectiologie. Saint Malo. 2017.
4. M. Gerin, C. Morin, S. Faiz, V. Martinez, C. Andrejak, N. Veziris, A. Bourgarit. Intérêt des anti-TNF dans les réactions paradoxales de tuberculose. Mycobactéries 2017, Saint-Quentin en Yvelines 2017.
5. F. Brossier, A. Renvoise, S. Pang, C. Bernard, N. Veziris, E. Capton, V. Jarlier, W. Sougakoff. L'analyse moléculaire d'une souche multirésistante de *Mycobacterium bovis* BCG révèle des changements dynamiques de population. Mycobactéries 2017, Saint-Quentin en Yvelines 2017.
6. Benmansour H, Charlois C, Mougari F, Dormant I, Launay N, Dufour M-O, Mouas H, Raskine L, Antoun F, Cambau E. Incidence de l'Infection tuberculeuse latente mesurée à l'aide des tests QuantiFERON TB Gold et QuantiFERON TB Gold-Plus chez les sujets contact d'un cas de tuberculose à Paris. 37^{ème} Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), 2017
7. E. Lecorche, F. Mougari, S. Haen, L. Raskine, L. Moulin, E. Cambau. Comparaison des différentes techniques d'identification de *Mycobacterium chimaera* disponibles dans les laboratoires de microbiologie clinique. Mai 2017, 5^{ème} conférence Mycoclub – CASFM, UVSQ Montigny-le-Bretonneux
8. B. Wyplosz, Mougari F, Al Rawi M, Baillon C; Marigot-Outtandy D, Le Dû D, Jachym M, Hervé V, Raskine L, Cambau E. Visualiser les bacilles tuberculeux viables dans les expectorations pour décider de lever les mesures d'isolement. 18eme Journées Nationales d'Infectiologie. Juin 2017.
9. F. Mougari, S Haenn, E. Lecorche, L Moulin, E Cambau. Standardisation de la recherche de mycobactéries dans l'eau, Congrès de la Société Française de Microbiologie, Paris, octobre 2017

Communications internationales sur invitation

1. V. Jarlier. Antibiotic resistance in hospital setting, meeting Chinese Medical Association & Fondation Mérieux, 23 novembre 2017, Pékin, Chine
2. V. Jarlier. Antibiotic resistance, surveillance & control, French-Chinese Medical meeting, 26 novembre 2017, Canton, Chine

Communications nationales sur invitation

1. Aubry. Nouvelles techniques diagnostiques des infections ostéo-articulaires. 36ème Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris. 2017
2. Veziris N. MDR, XDR : quoi de neuf? 18ème Journées Nationales d'Infectiologie, Saint-Malo, 2017

3. Veziris N. «Emergents et oubliés» : Mycobactéries non tuberculeuses. Journées du Colbv, Paris, 2017
4. Robert J. Résistance et multirésistance aux antibiotiques en pathologie humaine. In « Conférence OneHealth de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort ». Maisons-Alfort 28 mars 2017.
5. Sougakoff W. « Genomic variability of clinical isolates in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on MIRU-VNTR and Whole Genome Sequencing: implications for epidemiology and pathogenesis of multidrug resistant strains. Congrès "Mycobactéries 2017" 5ème conference MYCOCLUB (SFM), Montigny-le-Bretonneux, 2017
6. Sougakoff W. Pour ou Contre le génotypage de toutes les souches de *Mycobacterium tuberculosis* en France ? Journée Nationale 2017 d'information et d'échange sur la tuberculose. Paris, 2017
7. Robert J. Diagnostique et prise en charge des infections post-opératoires du genou. In « Le genou : Congrès de la Fédération Française des Associations de Médecins Conseils Experts ». Lisbonne, Portugal, 24 mars 2017.
8. N. Veziris. Nouveaux antituberculeux. 37ème Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2017.
9. N. Veziris. Tuberculose pulmonaire en France en 2017. Journées Pierre Bourgeois. Paris. 2017.
10. N. Veziris. Nouveaux antituberculeux. Société Médicale des Hôpitaux de Paris. Paris. 2017.
11. E. Cambau : BK-gestion au laboratoire ; 93eme journées de médecine interne de la Société Médicale des hôpitaux de Paris ; Paris janvier 2017
12. E. Cambau : Mise au point sur les infections à mycobactéries et générateurs thermiques, Congrès de la Société Française de Perfusion et congrès de la société française de chirurgie thoracique et cardio-vasculaire, Nice juin 2017
13. E. Cambau : Etude de la résistance aux antilépreux ; Assemblée générale de la Fondation Raoul Follereau, Paray le Monial, septembre 2017
14. E. Cambau : Antibiorésistance dans la lèpre. Congrès de la Société Française de Microbiologie, Paris, octobre 2017

Émissions radio, TV

Sougakoff W, Aubry A, Robert J. Emission "Antibiotiques", Science et Vie TV, Fred Courant

Organisation de colloques / congrès

1. Nicolas Veziris et Emmanuelle Cambau: Membres du conseil scientifique du congrès annuel de la Société Française de Microbiologie
2. Nicolas Véziris : membre du conseil scientifique des Rencontres Interdisciplinaires de Chimiothérapie Anti-Infectieuse
3. Nicolas Véziris : membre du conseil scientifique du congrès annuel Mycobactéries du Myco-Club.
4. Wladimir Sougakoff et Emmanuelle Cambau : Organisation dans le cadre de ITMO-I3M INSERM du symposium « NGS for TB : applications et perspectives en diagnostic ». 2017
5. Jérôme Robert : co-organisation avec SPF et la DGS des 6èmes rencontres nationales sur la tuberculose, 31 mars 2017

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

7.1. Santé animale

Nous poursuivons notre collaboration avec nos collègues des laboratoires en santé animale, principalement celui de la tuberculose bovine et de mycobactériologie animale (Laboratoire National de référence, Maisons-Alfort) (Dr Maria-Laura BOSCHIROLI).

En 2017, nous avons initié une enquête avec SPF (Dr Alexandra Mailles) sur la transmission animal-homme de la tuberculose bovine. Plusieurs réunions ont préparé le travail d'enquête qui a été mené sur les cas de tuberculose à *M. bovis* de plusieurs années, déclarée par les laboratoires du réseau Azay-mycobactéries Les cas sont étudiés pour leur potentielle proximité avec des animaux malades et les souches pourront être comparées en collaboration avec le LNR si besoin.

Nous participons régulièrement aux réunions communes avec les vétérinaires et les responsables de l'assurance médicale des éleveurs (MSA, Dr G Deffontaines) 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 chez les animaux sauvages.

7.2. Environnement

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

Nos activités dans ce domaine se déroulent dans 2 axes : (a) développements techniques et (b) expertise lors d'événements.

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.

Développements en 2017 :

- Etude du lien entre les mycobactéries de l'eau et les amibes,

Nous avons montré (Delafont et al, Science Report 2017) que l'échappement de *M. llatzenrense* (espèce proche de *M. chelonae*) aux amibes était lié à l'expression de facteurs de virulence proche de ceux de *M. tuberculosis*. De nouvelles études ont débuté en 2017 dans le cadre de la Thèse de Sciences de Emmanuel Lecorche (AHU, CNR Lariboisiere), en particulier sur le lien entre pathogénicité des mycobactéries et survie dans les amibes.

- validation en aveugle du protocole de recherche des mycobactéries dans l'eau avec le laboratoire de Eau de Paris. Le protocole a été présenté à l'AFNOR et une simplification du protocole est à l'étude. Le protocole sera mis à disposition sur le site du CNR d'ici peu.

Ce protocole a été en particulier appliqué à la recherche de *M. chimaera* dans les eaux de générateurs thermiques (voir § alertes).

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 non tuberculeuses suspects d'être d'origine environnementale.

En 2017 (cf section 4 « Alertes » pour les détails) nous avons participé aux enquêtes concernant des cas groupés de tuberculose ou d'infections à mycobactéries non tuberculeuses.

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 car il existe des laboratoires spécialisés pour cela.

8. Programme d'activité pour les 2 années suivantes

8.1. Expertise

L'équipe du CNR-MyRMA est à la disposition des collègues bactériologistes des laboratoires de biologie médicale, hospitaliers et privés, soit directement par téléphone ou mail soit à travers le site internet <http://cnrmyctb.free.fr>. Nous avons répondu à environ 1500 appels et mails par an.

8.1.1. Nous continuerons à concentrer nos efforts d'expertise de routine pour les laboratoires français :

- pour ***M. tuberculosis* complex** : sur les **souches anormales ou résistantes** et, inversement, limiter le travail sur les souches multisensibles (aujourd'hui ~1/3 des souches de *Mtb* reçues) qui peuvent plus facilement être prises en charge par les laboratoires de mycobactériologie de routine, en dehors de situations particulières (suspicion de résistance, intolérance aux antituberculeux de 1ère ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats...)

Ce choix introduit délibérément un biais de recrutement 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, mais des statistiques robustes sont établies par les travaux menés à travers nos 2 réseaux partenaires.

En revanche, l'analyse des souches reçues permet une étude précise et la plus exhaustive possible des mécanismes de résistance prévalents en France.

- pour les **mycobactéries non tuberculeuses (MNT)** : sur les **cas avérés d'infections**. Nous étudions en particulier la résistance aux antibiotiques chez les cas ayant déjà fait l'objet d'un traitement (échecs thérapeutiques et rechutes). En effet, les infections à mycobactéries atypiques n'étant pas contagieuses, il n'y a pas a priori de résistance primaire liée à la transmission d'une souche résistance d'un autre patient.

Nous étudions aussi les cas d'infections associées aux soins, en complétant nos analyses sur la souche responsable d'infection, par celles sur les souches de mycobactéries résultantes d'une investigation environnementale, menée souvent avec les ARS et l'aide d'organismes spécialisés dans la bactériologie environnementale, telles que « Eau de Paris ».

8.1.2. Techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents

Stratégie d'identification des mycobactéries non tuberculeuses

L'amélioration des méthodes d'extraction protéique et des bases de données nous permet maintenant de placer la **spectrométrie de masse en MALDI-TOF en 1ère intention** comme outil de screening pour l'identification des MNT les plus courantes (Brucker, bases Mycobactéries V3.0 et 4.0), si besoin après réisolement en subculture. Lorsque les résultats sont insuffisants, les méthodes de biologie moléculaire sont appliquées, en commençant par **l'amplification de un ou plusieurs gènes ou séquences cibles** parmi les suivantes (*hsp65*, *rpoB*, *rDNA16S*, région intergénique *16s-23*). Les produits amplifiés et séquencés sont comparés (outils BioEdit et Clone Manager) aux séquences des bases de données externes (NCBI) et de nos propres bases de séquences issues de l'étude de souches de référence pour constituer une banque de données internes.

Enfin, la **confrontation avec les résultats de l'antibiogramme phénotypique et moléculaire** permettra en cas de doute de **vérifier la cohérence des résultats**. En effet, chaque espèce de MNT a un profil de sensibilité aux antibiotiques propre correspondant au profil des souches sauvages.

Tests génotypiques de résistance aux antimycobactériens

- Pour les **antituberculeux « piliers » du traitement standard (rifampicine, isoniazide)**, nous utiliserons en priorité le test **GenoType®MTBDRplus**. Lorsque ce test ne détectera pas de mutation alors qu'il y a une très forte suspicion de résistance à l'isoniazide (ou à l'éthionamide, proche de l'isoniazide), l'exploration moléculaire sera complétée par le **séquençage complet des gènes *katG*, *inhA*, *ethA*, *ethR***. Nous serons plus rarement amenés à séquencer tout le gène *rpoB* car la résistance à la rifampicine causée par une mutation hors de la région « chaude » du gène *rpoB* incluse dans le test est rare. Pour le pyrazinamide, nous nous baserons sur le séquençage complet du gène *pncA* qui code pour la pyrazinamidase, activateur du pyrazinamide.

- **Pour les souches de TB-MDR**, nous utiliserons en priorité le test **GenoType®MTBsl** qui explore les mutations conférant la résistance à : fluoroquinolones, amikacine, kanamycine, capréomycine. L'évaluation que nous avons faite récemment de la nouvelle version de ce test (Brossier et al. 2016) nous a montré que la sensibilité de détection de la résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides était très augmentée.

- Nous pourrions avoir besoin, en complément, d'effectuer le **séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB*** pour les quinolones, *rrs* et *eis* pour les aminosides, la région de *embB* incluant les codons G406 et Q497 et la zone intergénique *embC-embA* pour l'éthambutol, *ethA* et *ethR* pour l'éthionamide, *rrl* et *rplC* pour le linézolide et *rv0678* et *tatpE* pour la bédaquiline.

- La détection moléculaire de la **résistance** aux antibiotiques **chez les MNT sera basée principalement sur le séquençage des gènes** : (a) *rrl* codant l'ARN 23S pour la résistance acquise à la clarithromycine, (b) *erm(41)* pour la résistance naturelle à la clarithromycine chez les sous-espèces du complexe *M. abscessus*, (c) gène *rrs* codant l'ARNr16S pour la résistance acquise à l'amikacine.

D'autres séquençages sont effectués ponctuellement : *rpoB* pour la rifampicine, *gyrA* et *gyrB* pour les fluoroquinolones.

Nous utiliserons en routine le test commercialisé GenoType NTMDR®. Ce test permet la détection des mutations *rrl* et *rrs* pour les principales espèces isolées : *M. avium* complex (comprend *M. avium*, *M. intracellulare* et *M. chimaera*), *M. chelonae* et *M. abscessus*. Ce test permet aussi de différencier les sous espèces de *M. abscessus*, en donnant les résultats de génotype naturel lié aux séquevars du gène *erm(41)*.

De nouvelles mutations seront systématiquement recherchées chez les souches de MNT phénotypiquement résistantes aux macrolides (clarithromycine et azithromycine), en particulier dans les gènes des protéines ribosomales L4 (*rplV*) L22 (*rplD*) et *whiB*, lorsque la trousse GenoType-NTMDR® ne détectera pas de mutation dans les gènes *rrl* et *erm(41)*.

Pour *M. fortuitum*, naturellement très sensible aux fluoroquinolones, nous étudierons les mutations de *gyrA* et *gyrB* dans les souches pour lesquelles les CMI seront supérieures à la valeur modale.

- Pour *M. leprae*, nous réaliserons le diagnostic bactériologique des cas de lèpre suspectés dans les DOM-TOM ou en France métropolitaine chez les sujets ayant vécu dans les pays d'endémie en combinant (a) l'examen microscopique d'une biopsie cutanée prélevée par punch de 3 ou 4 mm sur une lésion typique, (b) une PCR spécifique d'espèce très sensible (ciblant les séquences répétées RLEP) et (c) une PCR multiplexe des gènes de résistance à la rifampicine, aux quinolones et à la dapsonne. L'application de cette stratégie, que nous avons mise au point il y a quelques années, est maintenant facilitée par la commercialisation de la trousse GenoType LepraeDR® que nous avons contribué à concevoir avec un industriel allemand (Hain Lifesciences). Cette stratégie est progressivement adoptée par le réseau de surveillance de la résistance aux antituberculeux de l'OMS.

Antibiogramme phénotypique propre à chaque espèce de mycobactéries non tuberculeuses

Dans le cadre général des infections à MNT, notre **objectif est d'identifier de façon pertinente la résistance et la sensibilité aux antibiotiques**, afin de pouvoir proposer un traitement le plus efficace possible. Nous avons développé un test moléculaire de détection de la résistance en partenariat avec l'industriel allemand Hain Lifesciences (trousse GenoType NTMDR®) applicable à la clarithromycine.

Notre projet est maintenant de **développer une nouvelle gamme de tests phénotypiques de sensibilité des MNT aux antibiotiques** en complément des tests moléculaires. Les tests phénotypiques seront basés sur la détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI) mesurées selon des conditions propres à chaque espèce ou groupe d'espèce et le travail sera mené **en collaboration avec nos collègues européens du groupe ESGMYC** de l'ESCMID pour calculer les CMI modales, CMI50, CMI90 et CMI95 (correspondant à la concentration dite « epidemiological cutoff » ou ECOFF) propres à chaque MNT. Ces concentrations serviront de base à la détermination de concentrations critiques ou « breakpoints » dans le cadre du sous-groupe EUCAST sur les antimycobactériens que nous présidons depuis 2016.

Nous utiliserons aussi les recommandations qui seront issues des « guidelines » que nous sommes en train de finaliser dans le cadre d'un partenariat ESCMID-IDS-ATS-ERS.

8.1.2. Développement du séquençage génome entier (WGS)

Le WGS permet l'identification en une seule expérience de l'ensemble des polymorphismes présents dans une souche, y compris les SNP (single nucleotide polymorphism) et indels (insertions/délétions) importants pour le diagnostic, l'étude épidémiologique, les analyses phylogénétiques et la détection génotypique de la résistance aux anti-tuberculeux, ce qui en fait un outil polyvalent pour le diagnostic moléculaire de la tuberculose.

La stratégie et le workflow mis au point en 2017 (cf § séquençage) par chacun des 2 laboratoires permet maintenant de soumettre en routine au WGS les souches MDR ou épidémiques de *M. tuberculosis* et celles de MNT

En raison des restrictions budgétaires et des contraintes de remplacement de personnel, nous avons été contraints de limiter le nombre de souches soumises au WGS à ~70 en 2017. Si les nouveaux budgets le permettent, nous augmenterons ce nombre à 150-200 souches/an

WGS et *M. tuberculosis* (laboratoire Pitié-Salpêtrière)

Les données seront d'abord traitées pour déduire les génotypes de résistance pour les principaux antituberculeux par la recherche des mutations les plus fréquentes dans les gènes listés ci-dessus.

Une analyse plus détaillée qui permettra de confirmer et/ou de compléter les génotypes de résistance de façon très précise, en particulier lorsque les mutations de résistance ne se concentrent pas dans une région particulière du gène (mutations dont la fréquence est faible, par exemple celles dans *pncA* pour la résistance au pyrazinamide, cf. § 2).

L'analyse permettra de plus (i) une cartographie de la région du génome contenant le locus « DR » qui permet de **déduire la lignée phylogénétique** par interrogation de la data base SITVIT (Demay et coll., 2012) et (ii) une **comparaison à haute résolution des génomes complets des souches** par la détermination d'arbres phylogénétiques calculés à partir des matrices de SNP représentant l'ensemble des variations entre les génomes analysés. Cette analyse à haute résolution permettra **d'identifier les évènements potentiels de transmission** (moins de 5 SNP différents entre 2 génomes complets) et de décrire avec une grande précision les chaînes de transmission lors d'épidémies.

Les données issues du WGS "routine" seront adressées sous forme de compte-rendu synthétique aux laboratoires demandeurs qui pourront accéder à leurs données génomiques, s'ils le souhaitent.

Nous testerons progressivement la possibilité de remplacer les tests génotypiques de résistance et de phylogénie par le WGS. Il faudra cependant être prudent et analyser avec soin les délais d'obtention des résultats nécessaires aux prises de décision médicale, en tenant compte du fait qu'aujourd'hui on peut obtenir le diagnostic moléculaire de la mult- et de l'ultra-résistance en 3 à 5 jours. Il est donc possible qu'il faille maintenir des tests rapides spécifiques en 1^{ère} ligne.

WGS et mycobactéries non tuberculeuses (laboratoire Lariboisière)

Les connaissances des caractéristiques génomiques MNT sont beaucoup plus limitées que celles de *Mtb*. La connaissance de ces caractéristiques permettraient (a) de mieux étudier la clonalité des souches en cas d'épidémies ou pour affirmer l'origine de contaminations, (b) aider à la compréhension des mécanismes de résistance acquise et naturelle aux antibiotiques, (c) identifier de nouvelles espèces ou sous espèces et (d) mieux connaître leur réservoir et leur transmission à l'homme.

Notre projet est de mener **des études génomiques systématiques** en cas (a) **d'épidémie** (souches humaines et environnementales), (b) **d'infection liée aux soins** et (c) de **résistance acquise aux antibiotiques sous traitement**. Une collaboration a déjà été établie avec les collègues européens de l'ESCMID (groupe ESGMYC) et du réseau ERLNet-TB de l'ECDC pour l'étude de *M. chimaera* (cf § 2 et 4).

Nous testerons progressivement la possibilité de remplacer la REP-PCR par le WGS pour les comparaisons de souches entre les patients et les réservoirs suspectés, en commençant par les espèces les plus souvent responsables d'infections iatrogènes.

8.1.4. Evaluation de nouvelles techniques de diagnostic

Nous évaluerons les nouvelles trousse pour diagnostic de la tuberculose par amplification génique au fur et à mesure de leur apparition.

En particulier, nous étudierons dès que possible :

- la trousse DEEPLEX-MycTB de GenoScreen qui permet d'amplifier par multiplex puis de séquencer par deep sequencing 18 gènes impliqués dans la résistance de *M.tuberculosis*,
- le test de Cepheid Xpert XDR destiné à détecter les mutations de résistance de *M. tuberculosis* aux aminosides et quinolones.

8.2. Travaux de recherche appliquée

8.2.1. Retombées du WGS concernant la recherche sur les mécanismes de résistance chez *M.tuberculosis*

La masse considérable d'information fournie par l'approche WGS mise en place au CNR permettra d'envisager une valorisation au travers de **deux axes de recherches** concernant la résistance aux antibiotiques.

Le **1er axe** concerne l'étude des mécanismes de résistance aux antituberculeux. Dans l'état actuel de nos connaissances, la majorité des mutations impliquées dans la résistance aux antituberculeux sont connues, mais il existe pour chaque famille d'antibiotiques **un pourcentage significatif de souches pour lesquelles la résistance phénotypique reste inexpliquée**. La comparaison des génomes de ces souches particulières avec ceux d'un ensemble de génomes phylogénétiquement reliés provenant de souches sensibles devrait permettre **l'identification de nouvelles mutations spécifiquement associées au développement de la résistance** (mutations à sélection positive convergente, par opposition aux mutations aléatoires accumulées au cours de la dérive génétique).

Le **2ème axe** vise à analyser la **structure globale de la population des souches résistantes circulant en France par une approche phylogénétique**. Si le MIRU-VNTR permet l'identification des principales lignées de *M. tuberculosis*, il est clair que l'accumulation exponentielle des génomes de *M. tuberculosis* va permettre de dégager une vision beaucoup plus fine des différents clones de *M. tuberculosis* impliqués dans la diffusion de la tuberculose en France. La recherche de SNP spécifiques de ces clones pourrait permettre d'identifier **des facteurs génétiques liés à la capacité de diffusion des souches résistantes**, en particulier (i) des **mutations compensatoires** qui pourraient contribuer à diminuer le coût physiologique conféré par les mutations responsables de la résistance aux antibiotiques, (ii) des **mutations modifiant des fonctions liées à la virulence** des souches, et (iii) des **mutations à épistasie positive** qui modifient l'interaction existant entre 2 ou plusieurs gènes, et pourraient constituer un déterminant important du développement de la résistance multiple (Borrell et coll. 2013).

8.2.2. Caractérisation de mutations dans l'ADN gyrase et hors de l'ADN gyrase entraînant la résistance aux quinolones

L'étude des nouvelles mutations que nous découvrons au fil de l'eau à travers le travail d'expertise du CNR sera menée à l'aide d'un système *in vitro* que nous avons mis au point et qui nous permet d'introduire individuellement chaque mutation dans l'ADN gyrase de *M. tuberculosis* et de l'exprimer chez *E. coli*. Ceci permet d'identifier l'impact de chaque mutation sur l'affinité de l'enzyme pour les fluoroquinolones (anciennes comme l'ofloxacine, nouvelles comme la moxifloxacine). De plus, grâce à un modèle tridimensionnel d'ADN gyrase que nous avons mis au point, nous localiserons la mutation dans la structure 3D (cf ci-dessous).

Des résultats préliminaires suggèrent qu'il existe chez *M. tuberculosis* des mécanismes de résistance aux quinolones non liés à l'ADN gyrase. Nous explorerons ces mécanismes grâce au WGS et d'étude transcriptomique (collaboration Roland Brosch, Institut Pasteur Paris) d'une collection de souches résistantes aux FQ, isogéniques et cliniques disponibles au laboratoire et portant des mutations intéressantes (dans le facteur sigma ECF ; dans les gènes PriA ou FtsH impliqués dans la réplication et la division cellulaire).

8.2.3. Résistance à la clarithromycine

Nous poursuivons nos recherches sur les mécanismes de résistance à la clarithromycine, d'abord chez *M. abscessus* et les différents séquevars du gène *erm(41)* que nous avons décrit (Bastian et al. 2011, Mougari et al. 2016). Nous avons aussi montré récemment l'implication des protéines ribosomales dont L22 et L4, en trouvant une duplication du gène *rplV* dans une des souches de *M. abscessus subsp. massiliense*, qui était résistante à haut niveau à la clarithromycine mais sans mutations du gène *rrl*, codant l'ARN23S.

En reprenant la collection de souches résistantes, nous rechercherons d'autres mutations par séquençage complet du génome ou par amplicons étudiés par NGS.

Nous élargirons notre étude de la résistance à la clarithromycine à d'autres espèces de mycobactéries, dont *M. chimaera* et le complexe *M. fortuitum*.

8.2.4. Chimiothérapie expérimentale

Améliorer le traitement de la tuberculose à bacilles sensibles

Le traitement standard de la tuberculose à bacilles sensibles est basé sur une administration quotidienne durant 6 mois (éventuellement 3 fois par semaine durant une partie des 6 mois). Les améliorations visées sont soit le raccourcissement du traitement (à noter les échecs récents de traitements courts basés sur les fluoroquinolones) soit l'administration intermittente 1 fois par semaine. Nous mesurerons l'efficacité *in vivo* (a) de combinaisons à base de bédaquiline et de clofazimine qui semblent être synergiques, (b) de combinaisons de rifapentine (dérivé à demi vie longue de la rifampicine) avec la bédaquiline (elle-même à demi-vie longue) qui permettraient d'obtenir un traitement intermittent.

Facteurs déterminants in vivo la sélection des mutants résistants aux antituberculeux

Les connaissances actuelles sur l'émergence de mutants résistants sous traitement, reposent principalement sur des données *in vitro*. La compréhension des facteurs déterminant *in vivo* la sélection de mutants résistants aux antituberculeux (facteurs bactériens mais aussi facteurs de l'hôte) est essentielle pour mettre en place des stratégies préventives et des traitements adaptés.

Nous étudierons l'impact (a) de l'hypoxie régnant dans le granulome sur la sélection de mutants résistants. Pour cela, nous évaluerons le fitness de mutants résistants aux antituberculeux majeurs sélectionnés dans un nouveau modèle murin dit de Kramnik, caractérisé par des lésions nécrotiques granulomateuses semblables à celles de la tuberculose humaine ; (b) du statut immunitaire de l'hôte en comparant la fréquence et la caractérisation génétique des mutants sélectionnés *in vivo* chez des souris immunocompétentes et des souris immunodéprimés mimant d'une part l'infection à VIH (souris nude), et d'autre les déficits en interféron gamma (GKO).

Evaluation chez l'animal de l'activité de nouveaux antibiotiques sur l'ulcère de Buruli (*M.ulcerans*) et la lèpre

Nous mettrons à profit notre expérience dans ce domaine pour évaluer l'activité de nouveaux antibiotiques. Sur la base des données disponibles les candidats de choix sont :

. pour *M.leprae* (modèle dit de « bactéricidie proportionnelle » chez la souris Swiss) : bédaquiline (identification de la plus faible posologie active sur *M.leprae*, seule ou associée à la clofazimine), sutezolid (PNU 100480), tedizolid (TR700), Q203, solithromycine (CEM-101), selamectin, delamanide, PBTZ169.

. pour *M.ulcerans* (modèle de bactéricidie chez la souris BALB/c) : sutezolid, tedizolid, Q203, selamectin, PBTZ169.

8.3. Epidémiologie

8.3.1. Réseaux partenaires

Nous nous attacherons à pérenniser les 2 réseaux avec lesquels nous travaillons pour de nombreux travaux de surveillance

Le **réseau AZAY-mycobactéries** des collègues des laboratoires des CHU (39 laboratoires en 2017), mis sur pied il y a plus de 30 ans par les Prs Jacques Grosset (ancien directeur du CNR-MyRMA) et Bernard Carbonnelle. Ce réseau est piloté depuis quelques années par le Dr Nadine Lemaitre, ancienne AHU dans le laboratoire et aujourd'hui MCU-PH au CHU de Lille. Nous organisons avec ce réseau des rencontres, des enquêtes et des travaux communs (ex surveillance de la résistance 1aire et 2aire dans la tuberculose).

Le **réseau du CNR-MyRMA** que nous avons créé en 1992 et qui réunit les laboratoires de biologie médicale pratiquant la mycobactériologie (~200), nous pouvons diffuser des messages d'informations et mener des enquêtes spécifiques sur la tuberculose multi-résistante, les méningites tuberculeuses

8.3.2. Méningite tuberculeuse

Le nombre de cas de méningite tuberculeuse chez les enfants de 5 ans et moins est un indicateur important pour le suivi de la politique vaccinale par le BCG. Il est indispensable de poursuivre le croisement régulier des données obtenues dans le cadre de la DO et par le réseau de surveillance des laboratoires du CNR-MyRMA. Ce croisement des données est important car les travaux menés auparavant par l'InVS et le CNR-MyRMA ont montré qu'il y avait régulièrement des cas non connus d'aucun des 2 systèmes de surveillance (déclaration obligatoire et réseau CNR-MyRMA).

8.3.3. Tuberculose à *M. bovis*

La surveillance s'effectuera par 2 voies complémentaires :

- à travers les souches reçues au CNR : identification au niveau de l'espèce de toute souche de *M. tuberculosis* complex ce qui permettra d'identifier 10 à 20 cas par an.
- à travers le réseau AZAY-mycobactéries des laboratoires de CHU qui identifient au niveau de l'espèce une grande partie (~ les 2/3) des ~1500 souches de *M. tuberculosis* complex ce qui permettra d'identifier ~10-20 cas/an.

Une surveillance plus systématique est organisée **en collaboration avec SPF** pour décrire les caractéristiques des cas identifiés par les 2 voies ci-dessus : région, âge, métier (lien avec les animaux), pays de naissance...

Nous collaborons aussi **avec le laboratoire des mycobactéries de l'AFSA** (LNR, Maria-Laura Boschioli) et établirons une convention, qui nous permettra, si besoin, de procéder à des investigations supplémentaires, telles que le génotypage et la comparaison entre souches animales et souches humaines.

8.3.4. Multi-résistance et ultra-résistance

Ces dernières années, la France comme d'autres pays européens a du faire face à une augmentation significative du nombre de cas de tuberculose à bacilles ultra-résistants (XDR). Le traitement de ces cas est compliqué et il est important dès le début de la prise en charge de repérer les cas pouvant potentiellement héberger des souches XDR parmi les cas ayant des souches identifiées multirésistantes (MDR). Bien entendu, les analyses de biologie moléculaire peuvent aider à identifier rapidement une partie des cas XDR mais ceci n'est pas toujours le cas. Il nous semble utile d'identifier, parmi les cas MDR, des caractéristiques cliniques ou bactériologiques associées aux cas XDR. Pour cela nous utilisons tous les types de données que le CNR-MyRMA recueille sur les cas MDR ce qui aidera à identifier les caractéristiques des cas MDR sans résistance associée aux quinolones et aux aminosides (MDR « simples »), et celles des cas XDR, c.a.d. résistants aux quinolones **et** aux aminosides

8.4. Appui thérapeutique

Tuberculose

L'appui thérapeutique reposera sur :

- des **conseils téléphoniques directs** pour les cas les plus simples (~ 600 appels pour conseil thérapeutique « tuberculose MDR ou compliquée » en 2015).
- **les Réunions de Concertation Pluridisciplinaire (RCP), ou « TB-consilium France »**, organisées par le CNR-MyRMA à la Pitié-Salpêtrière et dont les activités sont centrées sur les cas de tuberculose MDR soumis par des collègues cliniciens. Les réunions se tiennent mensuellement à la Pitié-Salpêtrière et suivent une charte.

Nous ferons évoluer l'organisation des RCP sous forme de **visioconférences**.

Mycobactérioses

Nous sommes en train de mettre sur pied un RCP spécifique pour les mycobactérioses pour rationaliser les activités de conseils. Les cas de mycobactérioses sont en effet très variés en termes de circonstances médicales et épidémiologiques et d'espèce mycobactérienne en cause qui diffèrent beaucoup en terme de profils de sensibilité aux antibiotiques. Les demandes de conseils en la matière ont fait l'objet de ~250 appels téléphoniques en 2015.

Ces RCP **se tiendront à l'hôpital Lariboisière**, sur le modèle des RCP « tuberculose » de la Pitié-Salpêtrière, avec une possibilité de visio-conférence.

8.5. Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels

Nous continuerons à comparer les empreintes digitales génomiques (génotypage) des souches isolées de cas suspects d'être liés ou de patients et d'environnement (MNT) dans les circonstances suivantes :

Tuberculose

- 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 ARS et les Services de lutte antituberculeuse (SLAT),
- suspicions de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- suspicions de contamination inter-prélèvements au laboratoire,
- étude systématique des souches des cas de tuberculose à bacilles multirésistants, **ce qui permettra de continuer à participer au programme Euro-TB de l'ECDC**.

La méthode utilisée sera le MIRU-VNTR de 24 loci. Cette méthode **n'étant pas très discriminante au sein de la lignée Beijing**, nous **compléterons l'étude des souches de cette lignée par** : (a) les caractéristiques des souches (phénotype et génotype de résistance) et (b) des caractéristiques des patients (pays de naissance, ville où le diagnostic a été fait, liens familiaux) et, depuis 2015, par une

analyse de 4 loci supplémentaires dits « hypervariables ».

La mise en place du **séquençage génome entier (WGS)** permettra d'obtenir de résultats beaucoup plus discriminants, en particulier en cas de doute (cf § WGS).

Mycobactéries non tuberculeuses

- dans un contexte iatrogène ou associé à des soins esthétiques (tatouage, hydrothérapie..)
- enquêtes visant à identifier la source de contamination, en lien avec les autorités sanitaires : comparaisons des souches des patients entre elles et avec celles isolées dans l'environnement.
Les méthodes utilisées seront, selon l'espèce en cause : MLST, REP-PCR, ainsi que la spectrométrie de masse MaldiTof et le WGS implantés de manière progressive (cf. ci-dessus techniques en développement).

8.6. Registre des cas de tuberculose MDR

L'objectif est de suivre et documenter le devenir des patients atteints de tuberculose multirésistante (TB-MDR) en France, dont le parcours de prise en charge est souvent long et sinueux. Les dossiers du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile » du CNR MyRMA (cf. chapitre information, formation, conseil) concerne surtout la mise au traitement et les modifications du traitement mais rarement le devenir des patients à moyen terme.

Le principe est d'enregistrer les modalités de prise en charge, de réunir les informations cliniques, bactériologiques, génomiques jusqu'à l'issue de leur traitement ainsi que les informations sur le devenir des patients durant deux ans après le début du traitement.

Pour cela, nous avons conçu **un système de registre permettant la gestion de l'information des dossiers** de chaque cas de TB-MDR, simple et confidentiel et adapté à l'enregistrement et au suivi des données cliniques, biologiques, thérapeutiques, incluant la tolérance aux traitements des tuberculoses MDR en France.

Grâce à l'appui d'un financement partiel de la DGS nous avons **réalisé un logiciel de gestion informatisé partageable** entre les acteurs (cliniciens en charge des patients, laboratoire, CNR-MyRMA, groupe thérapeutique du CNR-MyRMA) avec la société Epiconcept sur le logiciel Voozanoo®.

Le logiciel disponible comporte les fonctionnalités suivantes : sécurisation des accès nominatifs ; accès en ligne permettant la saisie des données pour chaque cas ; dictionnaires (menus déroulants) pour faciliter la saisie (codes FINESS des établissements, base de données Thyriaque des médicaments, liste des code pays OMS...) ; module de recherche et de fusion de cas redondants (« doublons ») ; module de téléchargement-stockage de documents (pdf , TXT, MS-Word, jpg, mp4...) ; présentation des documents par type (radiologie, autre examens, compte rendu/lettre, ATU/DO...) ; fiches de synthèse des antituberculeux (modalités d'utilisation, effets 2aires..) ; liens vers les résumés des caractéristiques des produit (site ANSM) ; lien vers les textes de recommandations ; système de consultation et d'export des données (chaque site utilisateur peut exporter les données qu'il a stockées, et consulter toutes les données concernant les patients pour lesquels il est intervenu).

Après avoir obtenu en 2017 l'accord de la autorisation de la CNIL, nous testerons le système en grandeur nature en commençant par les dossiers de patients pris en charge dans les hôpitaux de l'AP-HP et au sanatorium de Bligny et dont les dossiers seront analysés par le groupe thérapeutique du CNR-MyRMA (soit ~1/3 des cas français).

8.7. Contribution aux réseaux de surveillance européens

Tuberculose

- Les données de résistance 1aire et 2aire aux antituberculeux seront envoyées à l'ECDC et, par ce biais, à l'OMS, grâce à la collaboration ECDC-OMS région Europe.
- Les données de génotypage des souches MDR seront envoyées à l'ECDC (réseau ERLN-TB des CNR européens) et intégrés au rapport de l'ECDC.
- Nous enverrons au réseau ERLN-TB les séquences des génomes complets des souches MDR (cf projet WGS).

Pour garantir la qualité des données transmises, le CNR-MyRMA **participera régulièrement aux contrôles de qualité européens** génotypiques et phénotypique organisés par l'ECDC.

Lèpre

Nos **résultats de surveillance de la résistance aux antilèpreux seront rapportés au réseau de surveillance OMS** (nouvelle stratégie OMS 2016-2020).

Nous pourrions de plus confronter, avec l'aide de Santé Publique France, les cas de lèpre des DOM-TOM à celui des déclarés à l'OMS par les pays limitrophes, ceci en particulier pour les DOM de l'Océan Indien (Mayotte, Ile de la Réunion) qui sont très proches de deux pays endémiques (Comores et Madagascar) et pour la Nouvelle Calédonie (enquête spécifique en 2018).

Mycobactérioses

Nous participerons aux actions de surveillance menés par l'ECDC sur les infections à MNT comme nous l'avons fait depuis 2015 sur les infections à *M. chimaera* post chirurgicales.

Annexe du § B1



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

Cas de tuberculoses à bacilles multirésistants (MDR) et ultrarésistants (XDR) pour lesquels des souches ont été reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2017

Alexandra Aubry
Jérémy Jaffré
Vincent Jarlier
Jérôme Robert
Nicolas Veziris

25/01/18

**Tableau 1 : Distribution des pays de naissance des cas de tuberculose MDR
(souches reçues au CNR-MyRMA 2006 –2017)**

Pays d'origine	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
France	11	5	6	6	4	8	9	5	15	23
Allemagne								1		1
Norvège				1						
Portugal		2	2		2	1			2	1
Total Europe Ouest	11	7	8	7	6	9	9	6	17	25
Albanie										1
Roumanie	2	1	5	1		6	3	3	9	6
Pologne										2
Bulgarie								1		2
Macédoine										
Moldavie	1	1	1		1	1	1			
Féd. Russie hors Tchétchénie	2		1	2	1	7	6	2	4	3
Fédération Russie - Tchétchénie	1	1	5	3	4	4	8	3	1	6
Arménie	1	1	2	3		4	2	1	3	1
Azerbaïdjan					1					
Géorgie	2	1	1	4	1	5	26	32	40	14
Kosovo								1		
Lituanie								2		
Ukraine		2					4	2	4	2
Total Europe Est et ex. URSS	9	7	15	13	8	27	50	47	61	37
Algérie	1	3	2	1	1	3	1	2	1	1
Maroc		1		2		1	2	1	1	6
Tunisie						1	1	1		1
Total Maghreb	1	4	2	3	1	5	4	4	2	8
Angola	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Bénin							1	1		
Cameroun		2	2		2			2	1	
Cap-Vert					1					1
Congo	3	1	4	4	1		3		3	2
Côte Ivoire	5	1	2	3	2	2	1	1	2	3
Djibouti	1									
Egypte							1		1	
Erythrée								1		
Ethiopie	1			1						1
Ghana				1						
Guinée Conakry	3	1	2		2	1	1	2	1	1
Madagascar-Comores		1		1				1		
Mali				1					1	1
Mauritanie				1		1				
Mozambique										
Niger			1							
Nigeria										1
Rep. Centrafricaine	1	1				1	2	1	2	2
RD Congo	4	5	1		2	5	5	4	6	1
Rwanda						1				
Sénégal	1		2	1	1		3	1	2	2
Somalie										
Soudan				1			1			
Tchad					1	1	1			
Togo	1							1		
Total Afrique hors Maghreb	21	13	15	15	14	13	19	16	20	17
Bangladesh							1		1	
Cambodge			1							
Chine	1	1	1	2	1	1	3	1	1	5
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		1
Sri Lanka		1							1	
Syrie				1						1
Thaïlande						1			1	1
Tibet		1			3			1		1
Turquie								1		
Vietnam			1	2	2	1		2	3	
Total Asie	4	3	4	10	9	7	9	7	9	9
Chili-Colombie				1						1
Brésil										1
Haïti					1	1	1			
Equateur								1	1	
Pérou	1	1			1			1		1
Total Amériques	1	1	0	1	2	3	1	2	1	3
Non précisé								1	1	
GRAND TOTAL	48	35	44	49	40	64	92	83	111	98

Pays d'origine	2016	2017
France	17	14
Allemagne		
Norvège		
Portugal		1
Total Europe Ouest	17	15
Albanie	1	
Roumanie	3	2
Pologne		
Bulgarie	1	1
Macédoine	1	
Moldavie	2	1
Féd. Russie hors Tchétchénie	3	1
Fédération Russie - Tchétchénie	4	
Arménie		
Azerbaïdjan		
Géorgie	3	19
Kosovo		
Lituanie		1
Ukraine	2	2
Total Europe Est et ex. URSS	20	27
Algérie	4	1
Maroc	1	2
Tunisie		
Total Maghreb	5	3
Angola	1	1
Bénin		
Cameroun	1	3
Cap-Vert		
Congo	2	2
Côte Ivoire	4	3
Djibouti	1	
Egypte		
Erythrée		
Ethiopie		
Gabon		1
Ghana		
Guinée Conakry	1	1
Madagascar-Comores		1
Mali		4
Mauritanie		
Mozambique	1	
Niger		
Nigeria	1	
Rep. Centrafricaine		
RD Congo	1	1
Rwanda		
Sénégal	1	
Somalie	2	1
Soudan	1	6
Tchad		
Togo		
Total Afrique hors Maghreb	17	24
Bangladesh	1	
Cambodge		1
Chine	2	3
Corée		
Inde	1	2
Indonésie		1
Irak		
Mongolie	1	
Népal		
Pakistan		2
Sri Lanka		
Syrie		
Thaïlande		
Tibet	3	1
Turquie		
Vietnam	1	1
Total Asie	9	11
Chili		
Colombie	1	
Brésil		
Haiti		1
Equateur		
Pérou	1	1
Total Amériques	2	2
Non précisé	1	0
GRAND TOTAL	71	82

Figure 1 : Répartition par groupe de pays de naissance des cas de tuberculose MDR (souches reçues au CNR-MyrMA 2006 – 2017)

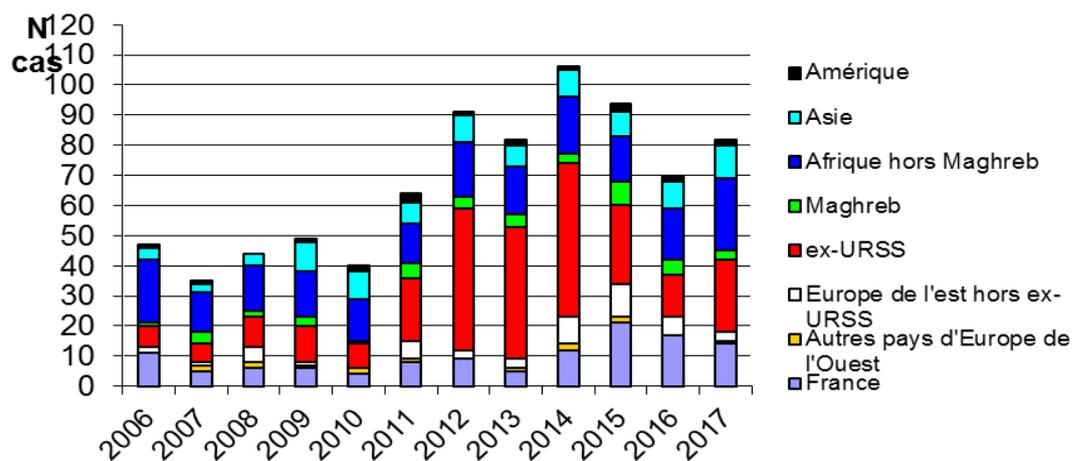


Tableau 2 : Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyrMA de 2004 à 2017

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
2015	1 (France)			9 (5 Géorgie, 2 Tchétchénie, 1 Russie, 1 Arménie)	10
2016	3 (France)			3 (1 Tchétchénie, 1 Moldavie, 1 Georgie)	6
2017	1 (France)			7 (1 Lituanie, 1 Russie, 5 Georgie)	8

Tableau 3 : Répartition par trimestre de réception au CNR-MyrMA de l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR de 2011 à 2017

Total MDR	dont		
	Europe de l'Est et ex-URSS	Ex-URSS	Géorgie

1er trim 2011	23	10	5	0
2ème trim 2011	15	4	3	1
3ème trim 2011	16	6	5	2
4ème trim 2011	15	8	8	2
1er trim 2012	21	12	11	5
2ème trim 2012	24	10	9	6
3ème trim 2012	23	12	11	7
4ème trim 2012	24	16	16	8
1er trim 2013	26	17	16	11
2ème trim 2013	21	10	9	7
3ème trim 2013	15	9	6	5
4ème trim 2013	21	11	11	9
1er trim 2014	31	16	12	9
2ème trim 2014	25	15	14	9
3ème trim 2014	26	14	12	11
4ème trim 2014	30	15	13	11
1er trim 2015	23	11	7	5
2ème trim 2015	32	13	10	4
3ème trim 2015	23	8	6	4
4ème trim 2015	21	6	3	1
1er trim 2016	16	6	4	0
2ème trim 2016	26	5	2	0
3ème trim 2016	15	5	4	2
4ème trim 2016	14	3	3	1
1er trim 2017	23	8	8	3
2ème trim 2017	21	4	3	3
3ème trim 2017	21	6	5	5
4ème trim 2017	17	9	8	8

Figure 2 : Répartition par trimestre de réception au CNR-MyrMA de l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR de 2011 à 2017

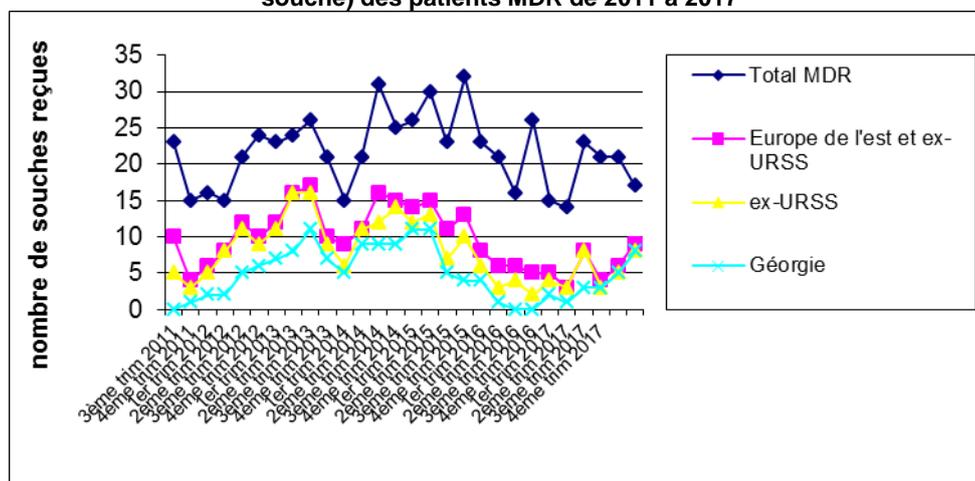


Tableau 4 : Répartition par régions des laboratoires ayant envoyé l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR au CNR-MyrMA en 2014-17

Region	N souches reçues en			
	2014	2015	2016	2017
Auvergne, Rhône-Alpes	13	11	5	5
Bourgogne, Franche-Comté	2	0	1	
Bretagne		2	2	3
Centre-Val-de-Loire	2	1	1	3
Corse	1	1		
Grand-Est	5	3	4	2
Guadeloupe				
Guyane				
Hauts-de-France	8	6	4	4
Île-de-France	58	48	32	41
La Réunion	2			1
Martinique				
Mayotte				
Normandie	6	3	3	4
Nouvelle-Aquitaine	2	11	6	6
Nouvelle Calédonie				1
Occitanie	7	5	2	3
Pays de la Loire		4	2	3
Polynésie Française			1	4
Provence-Alpes-Côte d'Azur	6	3	8	2
Total	112	98	71	82

Conclusions :

- La région Ile-de-France regroupe 50% des laboratoires ayant adressé des souches MDR au CNR, chiffre stable sur ces 4 dernières années. A noter que 5 souches nous ont été adressées de régions du Pacifique : 4 souches ont été isolées à Tahiti (cas reliés bactériologiquement) et 1 autre en Nouvelle Calédonie.
- Le nombre total de cas MDR est en augmentation par rapport à l'année dernière (+ 15,5%). En effet, nous totalisons 82 cas MDR en 2017 contre 71 en 2016.
Cette augmentation s'explique par :
 - o l'augmentation du nombre de cas issus de pays de l'Europe de l'Est et de l'ex. URSS (27 vs. 20 ; avec notamment une très nette progression des cas MDR issus de patients nés en Géorgie (19 vs. 3))
 - o l'augmentation du nombre de cas issus de pays d'Afrique hors Maghreb (24 vs. 17 ; augmentation principalement liée aux patients originaires du Mali et du Soudan)
- En 2017, le nombre de cas MDR nés en France est de 14, chiffre en légère baisse par rapport à 2016 (17 cas).
- Le nombre de cas XDR recensé en 2017 (8 cas) est stable par rapport à 2016 (6 cas) avec une proportion de cas XDR qui se maintient autour de 10% des cas MDR depuis 3 ans.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Missions du CNR

(Cahier officiel 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 non tuberculeuses 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.

Organisation du CNR

Le CNR-MyRMA repose sur 2 laboratoires de bactériologie médicale :

Un laboratoire coordinateur : laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix à Paris, site Pitié-Salpêtrière, responsable Pr Vincent Jarlier.

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

Chacun de ces 2 laboratoires maîtrise les techniques phénotypiques et génotypiques en mycobactériologie médicale (tuberculose, lèpre, infections à mycobactéries non tuberculeuses), sont équipés de secteurs de sécurité L3 permettant la manipulation de *M.tuberculosis*, et bénéficient d'un personnel compétent en mycobactériologie. Ceci permet à ces deux laboratoires de se suppléer mutuellement et d'assurer la continuité des activités d'expertise (périodes de maintenance et de contrôle du secteur L3 de l'un d'eux, problème technique, déficit momentané en personnel, périodes de congés...).

Ces 2 laboratoires mettent aussi en commun des centres d'intérêt complémentaires :

Laboratoire coordonnateur Pitié-Salpêtrière : aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour *M. tuberculosis*; surveillance épidémiologique des infections à travers les réseaux partenaires ; conseils thérapeutiques pour les infections inhabituelles (ex. tuberculose MDR...).

Laboratoire associé Saint Louis-Lariboisière : aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour les mycobactéries non tuberculeuse et *M.leprae* ; mycobactériologie environnementale ; conseils et alertes pour les infections liées aux soins ou à un réservoir environnemental ; tests immunologiques de la tuberculose.

Cette complémentarité permet de répondre à l'ensemble du cahier des charges et d'optimiser (i) les appuis aux collègues microbiologistes et cliniciens, (ii) les interactions avec les autorités sanitaires (Santé Publique France, DGS, ARS, CLAT).

Le CNR-MyRMA dispose d'équipes médicales et techniques comme suit (cf tableau ci-dessous pour détail) :

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

- 1 PU-PH chef de service, 2 PU-PH adjoints, 1 MCU-PH, et 1 PH du service de Bactériologie-Hygiène du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix et Université Paris 6 (1,35 ETP, financement APHP)
- 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 (1 ETP, financement AP-HP)
- 1 secrétaire (0,25 ETP, financement AP-HP)
- 1 cadre (0,1 ETP, financement AP-HP)
- 1 technicien de recherche en chimiothérapie expérimentale (financement fonds associatifs)
- 1 technicien de recherche en biologie moléculaire (financement Université Paris 6)
- 1 animalier (financement fonds associatifs)

Laboratoire associé (Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière)

- 1 PU-PH chef de service, 1 PHU, et 1 AHU du service de Bactériologie du Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière et Université Paris 7 (0,7 ETP, financement AP-HP)
- 1 ingénieur financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (1 ETP)
- 2 Techniciens (0,5 ETP, financement AP-HP)
- 1 secrétaire (0,1 ETP, financement AP-HP)

Liste nominative des personnels participants aux activités du laboratoire coordonnateur (site Pitié) et du laboratoire associés (site Lariboisière) : fonction, temps dédié au CNR-MyRMA en 2017 (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	Respons. labo. associé	0,15	Médecin biol.	PU-PH	Lariboisière	AP-HP
Veziris	Nicolas	Microbio/pneumologue	0,4	Médecin	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Jaffré	Jérémie	Microbiologiste	1	Pharm. biol.	PH contr.	Pitié	SPF
Aubry	Alexandra	Microbiologiste	0,1	Médecin biol.	PU-PH	Pitié	AP-HP
Brossier	Florence	Microbiologiste	0,1	Pharm. biol.	PH	Pitié	AP-HP
Sougakoff	Wladimir	Microbiologiste	0,3	Scientifique	MCU-PH	Pitié	AP-HP

Robert	Jérôme	Epidémiologiste	0,2	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Mougari	Faiza	Microbiologiste	0,2	Médecin Biol.	PHU	Lariboisière	AP-HP
Lecorche	Emmanuel	Microbiologiste	0,35	Médecin Biol	AHU	Lariboisière	AP-HP
Golamhosem	Shenaz	Technicienne	0,5	Technicienne	Tech	Pitié	AP-HP
Millot	Gérald	Technicien	0,5	Technicien	Tech	Pitié	AP-HP
Bekhti	Meriem	Technicienne	0,5	Technicienne	Tech	Pitié	<u>SPF</u>
Gandy	Lucas	Technicien	0,7	Technicienne	Tech	Pitié	<u>SPF</u>
Tomczyk	Julie	Technicienne	0,5	Technicienne	Tech	Pitié	<u>SPF</u>
Goumghar	Sabrina	Technicienne	0,3	Technicienne	Tech	Pitié	<u>SPF</u>
Charlier	Véronique	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Brisilliat	Christine	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Kumanski	Sylvain	Technicien	1	Technicien	Tech	Lariboisière	<u>SPF</u>
Catalano	Francesca	Secrétaire	0,25	Secrétaire		Pitié	AP-HP
Laurent	Caroline	Cadre	0,1	Cadre		Pitié	AP-HP
Dupriez	Isabelle	Secrétaire	0,1	Secrétaire		Lariboisière	AP-HP

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

Le réseau Azay-Mycobactéries

Depuis 1995, le CNR-MyRMA conduit la surveillance annuelle de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux grâce à 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 publiés qui ont montré que la sensibilité du réseau et la concordance des données avec celles de la DO étaient satisfaisantes.

Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~1.500 cas de tuberculose /an.

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, à travers le réseau créé spécifiquement pour cela et qui réunit l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie (~220 en 2016), la surveillance annuelle à visée exhaustive 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...).

Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~4.200 cas de tuberculose /an.

Le CNR-MyRMA est adossé à des unités de recherche labélisées :

Laboratoire coordinateur

Equipe INSERM « Mécanismes d'émergence et de diffusion de la multirésistance chez les Mycobactéries et les entérobactéries » intégrée à l'UMRS CR7-INSERM 1135 « Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (CIMI) », Paris 6, site Pitié-Salpêtrière).

Laboratoire associé

Equipe IAME (Infection, Antimicrobials, Modeling, Evolution), UMR1137 Inserm-Université Paris Diderot, IAME, Equipe 2 EVRest (ecology, evolution and therapeutic of virulence and resistance in bacteria) .

Locaux du CNR

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, 2e étage du bâtiment de la Pharmacie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, site Pitié-Salpêtrière, superficie totale du laboratoire 1000 m2.

Les activités se déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité L3 (150 m2) consacré à la mycobactériologie, à la manipulation des bactéries de classe 3 (salmonelles, brucelles...) et aux alertes Biotox.

- dans les pièces adjacentes (100 m²) 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 PM Curie, site Pitié-Salpêtrière, 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^{ème} étage du bâtiment CIVIALE, superficie totale du laboratoire 964 m².

Les activités du CNR se déroulent :

- dans le laboratoire de sécurité L3 (construction modulaire de 50 m² à l'extérieur du bâtiment Civile).
- dans des pièces (39 m²) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie fluorescente) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage...).

Principaux équipements du CNR

Laboratoire coordonnateur (Site hospitalier Pitié-Salpêtrière)

Laboratoire de sécurité L3 et ses annexes

- Equipements de cultures des prélèvements médicaux en milieux solides et liquides,
- Automate pour hémocultures des mycobactéries,
- Equipements pour antibiogrammes en milieu solide et liquide,
- Equipements pour l'identification phénotypique classique,
- Equipement pour l'extraction d'acides nucléiques (cf. ci-dessous),
- 5 postes de sécurité microbiologiques,
- 13 incubateurs,
- Automate de culture en milieu liquide,
- Autoclave double entrées,
- Autoclave vertical Lequeux,
- Microscopes à fluorescence lampe LED,
- Microscopes classiques,
- Spectrophotomètre (Ultrospec10, Dutscher),
- Sorbonne pour coloration,
- Colorateur de lames,
- 4 centrifugeuses,
- bains à sec chauffants,
- Coagulateur pour la préparation des milieux de Lowenstein-Jensen.

Biologie moléculaire

- Extracteur d'acides nucléiques de sécurité (pression négative) Roche MagNA Pure LC,
 - amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Biorad iCycler, Biorad DNAEngine, GeneAmp PCR system 9700),
 - amplificateurs automatisés de PCR « temps réel » (Clemens25, ABI7000),
 - Amplificateur FluoroCycler 12 (Hain Lifescience) pour les tests FluoroType MTB (diagnostic de tuberculose dans les prélèvements),
 - Extracteur d'ADN Arrow Norddiag (Hain Lifescience) automatisé pour l'extraction de l'ADN de *M. tuberculosis* à partir de prélèvements,
 - blocs d'hybridation manuel TwinCubator pour les bandelettes Hain,
 - Automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain,
 - Imageur Biorad Chemidoc-XRS pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV et des membranes d'hybridation en chimioluminescence,
 - BioAnalyser 2100 Agilent,
 - Système de filtration sur plaques pour la purification des PCR,
 - 1 bain à sec chauffant,
 - Logiciel d'assemblage et d'analyse des données de séquençage WGS (BioNumerics).
-
- **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,
 - plateforme de génotypage de SNP à haut débit « ILLUMINA » (puces BeadChips),

- Scanner pour lecture des lames microarrays hybridées avec sondes Cy3/Cy5,
- spectromètres microplaques 384,
- Spectromètre de masse MALDI-TOF,
- Spectromètre de masse NanoLC-ESI-MS/MS,
- Robot de fractionnement Freedom EVO150 (Tecan).

Autres équipements

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

Animalerie (capacité totale : 1000 souris) :

- isolateurs rigides,
- armoires pour maintenance des animaux infectés en pression négative,
- isolateurs souples pour maintenance des animaux immunodéficients,
- 2 postes de sécurité microbiologique pour les dissections et cultures,
- étuves,
- 1 broyeur d'organe GentleMacs (Miltenyi)
- Autoclave pour destruction des déchets,
- Accès à l'animalerie A3 de la faculté de médecine Pierre-et-Marie Curie.

Laboratoire associé (Site hospitalier Lariboisière)

Laboratoire de sécurité L3

- 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)
- Équipement complet de mycobactériologie médicale classique (réactifs de décontamination, centrifugeuses, coloration auramine et Ziehl, microscopes à fluorescence...),
- Matériel et équipement pour identification rapide phénotypique,
- Equipement et automate pour antibiogramme en milieu liquide MGIT,
- 1 module de suivi et d'analyse de la sensibilité des isolats aux antituberculeux de 1ère et seconde ligne (TB eXiST BD),
- 1 Système de lecture de microplaques Sensititre et logiciel de lecture et d'interprétation VIZION®.

Biologie Moléculaire

- 2 extracteurs automatiques d'acide nucléique (EZ1 QIAGEN et Arrow NORDIAG),
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques (Heliosy Thermos),
- 1 spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000,
- 5 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR,
- 1 amplificateur automatisé pour PCR « en temps réel » (Cepheid 4 modules),
- 2 amplificateurs pour PCR « en temps réel » (Rotor Gene et Smart Cycler),
- 1 automate d'hybridation GT-Blot 20 pour les bandelettes Hain Biocentric,
- 1 système d'hybridation manuelle TwinCubator,
- 2 séquenceurs 16 capillaires Applied Biosystem d'accès facile (commun à plusieurs laboratoires),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- 1 équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé (Pharmacia LKB Gene Navigator),
- 1 imageur (GelDoc XR Biorad) pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV,
- 1 automate pour électrophorèse capillaire d'ADN (Agilent) commun à plusieurs laboratoires pour test de génotypage Diversilab®,
- 1 séquenceur Miseq (Illumina) partagé avec le service de Génétique
- 1 licence de logiciel Bionumerics

Autres équipements

- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex, Bruker), et base V5 CEIVD
- Automate d'immuno-analyse ETIMAX2000, pour le dosage d'interféron gamma par le test Quantiféron® Gold Plus in Tube (Cellestis),
- 1 autoclave de destruction.

Collections de souches

Description des souches

Nous mettons à disposition des laboratoires, des souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux de première ligne. 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.

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

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

Souche	de	Génotype	Phénotype de résistance en milieu de Löwenstein Jensen
<i>M.tuberculosis</i>			
Isoniazide bas niveau		<i>inhA</i> -15c->t	100% résistance isoniazide 0,2 mg/l, sensible 1mg/l
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

Enfin, le CNR-MyRMA conserve l'ensemble des souches adressées pour expertise pour une durée de 10 ans (environ 10.000 souches).

Condition de stockage

Le stockage de l'ensemble de ces souches est organisé sous forme de soucier 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 sont disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français réalisant des tests de sensibilité de deuxième ligne.

L'envoi de souches XDR fait l'objet d'une réglementation particulière et n'est possible qu'à des laboratoires détenteurs d'une autorisation MOT.

Démarche qualité

Techniques standardisées

Le groupe de mycobactériologistes des CHU (« AZAY mycobactéries ») a rédigé des techniques

communes 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, dans le cadre du groupe MycoMED de la Société Française de Microbiologie.

Contrôles de qualité externe en 2017

a. chacun des 2 laboratoires du CNR-MyRMA a participé en 2017 au contrôle de qualité externe (CQE) organisés dans le cadre du réseau européen de l'ECDC ERLNET-TB

Le contrôle, assuré par la société Instand (Dusseldorf, Allemagne), comportait :

- 5 échantillons pour l'examen microscopique
- 5 échantillons pour la culture
- 5 échantillons pour le diagnostic génotypique de tuberculose (PCR)
- 5 souches de mycobactéries non tuberculeuses pour identification
- 5 souches pour les tests de sensibilité génotypiques à 9 antituberculeux, soit 45 tests
- 5 souches pour les tests de sensibilité phénotypiques à 12 antituberculeux soit 60 tests

Au total, ce CQE représentait **125 tests** à effectuer dans chacun des 2 laboratoires.

Les résultats obtenus étaient conformes dans chacun des 2 laboratoires qui ont donc reçu un certificat de qualité.

b. Le CNR-MyRMA participe aux **contrôles de qualité européens 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 par la méthode MIRU-VNTR 24.

- Les résultats du 1er CQE réalisé en **2010** ont été publiés en 2012 (*de Beer JL et al. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):662-669*).
- Les résultats du 2ème CQE réalisé en **2011** ont été publiés en 2014 (*de Beer JL et al. Int J Tuberc Lung Dis. 2014 May;18(5):594-600*).
- 3ème CQE en 2013
- 4ème CQE en 2014

Les résultats obtenus par le CNR-MyRMA lors des 4 premiers CQE **étaient très bons.**

- En raison d'une erreur d'adressage, nous n'avons pas reçu les échantillons du 5^{ème} CQE organisé en 2015.
- 6^{ème} CQE en 2016 : les résultats du 6^{ème} CQE réalisé en 2016 **étaient excellents** (score de 100%)
- 7^{ème} CQE en 2017 : les résultats étaient suffisamment précis (score 95%) pour recevoir un certificat de qualité pour 2017. La seule erreur mineure était l'absence de détection d'un **locus double** pour lequel les organisateurs du CQE précisent qu'il était « très difficile à détecter » (6 des 14 laboratoires participants ont rapporté ce double locus).

c. en 2017, le CNR-MyRMA a aussi participé au **2ème CQE européen (WGS pilot EQA) de génotypage WGS organisé par le Tuberculosis Reference Laboratory of National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, The Netherlands, R. Anthony).**

10 extraits d'ADN de *M. tuberculosis* ont été analysés par séquençage complet des génomes (technique Illumina). **Les résultats obtenus étaient excellents.** L'accord entre les résultats génomiques et les phénotypes de résistance étant de 100%. Le génotypage à partir des résultats génomiques a permis de déterminer sans ambiguïté les lignées auxquelles se rattachent les 10 souches. Notre score pour l'identification des liens phylogénétiques entre les souches était également de 100%.

d. Contrôle de qualité externe organisé en 2017 par le CNR-MyRMA pour les laboratoires du réseau « AZAY-mycobactéries »

En 2017, le CNR-MyRMA a conçu et organisé, à la demande de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), un contrôle de qualité portant sur l'identification des mycobactéries et les tests de sensibilité de *M. tuberculosis* complexe destiné à l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie en France (dont les laboratoires du réseau «AZAY-mycobactéries»).

Les résultats sont présentés dans le § 2.1.

Accréditation

Le CNR-MyRMA s'est inscrit dans la démarche générale d'accréditation (norme NF EN ISO 15189) des laboratoires des groupes Pitié-Salpêtrière – Charles Foix (AP-HP) et Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal (AP-HP). Le CNR-MyRMA participe aux différents groupes de travail mis en place pour l'accréditation globale 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, les personnels des laboratoires hébergeant le CNR.

Chacun des deux laboratoires (coordonnateur et associé) du CNR-MyRMA est, tout au long du processus qui s'étalera sur 6 ans, accrédité à travers l'ensemble des laboratoires du groupe hospitalier auquel il appartient (« pôle biologie médicale »), ensemble considéré par le COFRAC comme un laboratoire unique (cf pièces jointes dossier candidature 2017-21).

Le Dr Faiza MOUGARI a suivi en 2017 un DU de Qualité et de formation à l'accréditation (Paris Descartes).



Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

1. Techniques de référence disponibles au CNR-MyRMA

1.1. Techniques phénotypiques

Techniques de diagnostic

- Microscopie,
- Cultures en milieux solides et liquides.

Techniques d'identification

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

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

Techniques de routine

- Antibiogramme 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, bédaquiline) n'étant pas commercialisés, ils sont préparés et contrôlés par le CNR-MyRMA,
- Antibiogramme par la méthode de référence (méthode des proportions) sur milieu liquide (MGIT960 TB),
- Antibiogramme 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 MGIT avec utilisation du logiciel TBEXiST appliqué à une détermination semi-quantitative de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux
- 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 par bandelettes E-test pour certaines mycobactéries à croissance rapide,
- Pour *M.leprae* : inoculation dans le coussinet plantaire de la souris (Swiss et Nude) et observation de la croissance bactérienne chez les animaux traités avec les antibiotiques, par comparaison avec des animaux témoins non traités. Le résultat est disponible après 8 à 12 mois.

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

- Méthodes in vitro : détermination des CMI en milieu Middlebrook par la méthode des quadrants, 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*.

1.2. Techniques génotypiques

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

Techniques génotypiques disponibles au CNR-MyRMA

a. Identification des espèces

Mycobactéries	Techniques commercialisées	Séquençage
<i>M. tuberculosis</i> complex	Cepheid Xpert MTB/RIF Génotype MTB-DR _{plus} * Génotype MTB-DRsl* Real Accurate <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Patho Finder)	
Espèces au sein du complexe <i>tuberculosis</i>	MTBC* MIRU-VNTR 2	
Mycobactéries non tuberculeuses "courantes"	Génotype CM* Genotype NTM-DR	
Mycobactéries non tuberculeuses "rares"	Génotype AS*	
Toutes		<i>rpoB</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> <i>rrs</i> , <i>rrl</i> Intergen.16s-23s(ITS) <i>hsp65</i>
<i>M. abscessus</i> complex		<i>Erm(41)</i>
<i>M. ulcerans</i>		IS2404
<i>M. leprae</i>	Génotype Leprae-DR*	RLEP

* Gamme Genotype, Hain Lifescience , en attente nouvelle version

b. Détection de mutations déterminant la résistance acquise aux antimycobactériens

Mycobactéries	Techniques commercialisées	Séquençage	Antibiotiques
<i>M. tuberculosis</i> complex	Cepheid Xpert RIF Gén. MTB-DR _{plus} * Génotype MTB-DRsl*VER 2.0	<i>rpoB</i> <i>katG</i> <i>inhA</i> <i>pncA</i> <i>ethA</i> <i>ethR</i> <i>rrs</i> , <i>eis</i> , <i>tlyA</i> <i>rpsL</i> <i>embB</i> , <i>embC-A</i> <i>rrl</i> , <i>rpIC</i> <i>atpE</i> , <i>Rv0678</i>	rifampicine rifampicine, isoniazide, éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, fluoroquinolones rifampicine isoniazide isoniazide, éthionamide pyrazinamide éthionamide éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, streptomycine streptomycine éthambutol linezolid bédaquiline
<i>M. abscessus</i> complex		<i>erm(41)</i> , <i>rrl</i>	macrolides
Mycobactéries atypiques	Génotype NTM-DR*	<i>rrl</i>	macrolides
<i>M. leprae</i>	Leprae-DR*	<i>rpoB</i> , <i>gyrA</i> <i>folP1</i>	rifampicine, fluoroquinolones, dapsone
Toutes espèces		<i>rpoB</i> <i>gyrA</i> <i>gyrB</i> <i>rrs</i>	rifampicine fluoroquinolones luoroquinolones aminosides

* Gamme Genotype, Hain Lifescience

c. Génotypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques)

Mycobactéries	Techniques commercialisées	Autres techniques
<i>M. tuberculosis</i> complex	MIRU-VNTR 24 loci MIRU 4 loci hypervariables si souche Beijing	
Mycobactéries non tuberculeuses	REP-PCR Diversilab	Electrophorèse en champ pulsé

d. Séquençage génome entier (WGS)

Mycobactéries	Techniques
Toutes espèces	ILLUMINA MiSeq

2. Marqueurs épidémiologiques disponibles

- **Marqueurs de résistance** (mutations chromosomiques) pour *M.tuberculosis*
- **Marqueurs utilisés pour le typage** (phylogénie et empreintes digitales) :
- ✓ MIRU-VNTR 24 loci (+les 4 loci supplémentaires hypervariables spécifiques pour les souches Beijing) pour *M.tuberculosis*
- ✓ REP-PCR pour les mycobactéries non tuberculeuses
- ✓ Spectrométrie de masse MALDI-TOF pour les mycobactéries non tuberculeuses
- ✓ Electrophorèse en champ pulsé pour les mycobactéries non tuberculeuses
- ✓ SNP 14676, 1642875, 2935685 pour *M.leprae*
- ✓ **Séquençage génome** entier pour toutes les mycobactéries

Stockage des souches reçues au CNR-MyRMA

Les souches reçues sont conservées dans du 7H9 glycérolé dans un congélateur à -80°C.
Les biopsies de peau reçues au CNR-MyRMA pour recherche de *M.leprae* sont conservés à -80°C.
Les fichiers des souches stockées est informatisé sur des ordinateurs du réseau de nos 2 hôpitaux et bénéficient de ce fait de sauvegardes régulières.
Les ADN extraits des souches pour analyse de biologie moléculaire sont conservés dans des congélateurs à -20°C ou -40°C.

Stockage des souches de référence

Description des souches

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

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

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

Souche de <i>M.tuberculosis</i>	Génotype	Phénotype de résistance en milieu de Löwenstein Jensen
Isoniazide bas niveau	<i>inhA</i> -15CT	100% résistance isoniazide 0,2 mg/l, sensible 1 mg/l
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

Enfin le CNR-MyRMA conserve l'ensemble des souches adressées pour expertise pour une durée de 10 ans (environ 10.000 souches).

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

L'envoi de souches XDR fait l'objet d'une réglementation particulière et n'est possible qu'à des laboratoires détenteurs d'une autorisation MOT.

Liste des techniques (diagnostic/identification, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR-MyRMA pour les laboratoires de Bactériologie médicale désirant pratiquer la mycobactériologie

- 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 ou PCR temps réel) directement à partir des prélèvements de tout nouveau patient pour lequel l'examen microscopique est positif (recommandations du HCSP, 2014) ,
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* dans les cultures par hybridation directe avec amplification-hybridation sur bandelettes ou techniques immunochromatographiques (Ag MPT64), pour tout nouveau cas (recommandations du HCSP, 2014),
- Identification des mycobactéries non tuberculeuses courantes (*M.gordonae*, *M. avium-intracellulare* complex, *M. kansasii*) dans les cultures par spectrométrie Maldi-Tof ou amplification-hybridation sur bandelettes
- 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 la détection précoce de la multi-résistance par PCR avec sondes intégrées ou pCR puis hybridation inverse sur bandelettes ou séquençage, pour tout nouveau patient pour lequel les prélèvements ont un résultat d'examen microscopique positif (M+), ou pour lequel l'examen microscopique est négatif mais la culture positive (M-C+). Cette recherche peut être utilement couplée à la recherche de mutations conférant la résistance à l'isoniazide. Le résultat de ces tests doit pouvoir être disponible dans un délai maximal de 72 heures (recommandations du HCSP, 2014).

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 non tuberculeuses (ex. antibiogramme) : confinement L2,
- subcultures de *M. tuberculosis* complexe (ex. antibiogramme) : confinement L3.

Afin de pouvoir le plus rapidement possible fournir au personnel soignant et l'entourage familial des patients les éléments permettant de guider la prise en charge des patients et les mesures sanitaires (ex. isolement des patients et enquête dans l'entourage), l'identification des cultures positives doit être menée le plus rapidement possible (dans les 72h) avec des techniques applicables dans tous les laboratoires pratiquant les primocultures car ne nécessitant pas de subculture et donc pas de confinement L3 :

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