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

Laboratoire coordinateur

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière

Responsable : Pr Vincent JARLIER

Laboratoire associé

Laboratoire de Bactériologie- Hygiène

Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal

Responsable : Pr Emmanuelle CAMBAU

Rapport d'activité pour l'année 2010 et résumé de l'activité de la mandature 2006-2010

Mai 2011

DOSSIER SCIENTIFIQUE

Sommaire

A. FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE COORDONATEUR ET DU LABORATOIRE ASSOCIE 3

B. PRESENTATION DU CONTEXTE 4

C. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE COORDONATEUR ET DU LABORATOIRE ASSOCIE 6

C.1. ORGANISATION PROPOSEE POUR REPONDRE AUX EXIGENCES DU CAHIER DES CHARGES 6

C.1.1. Répartition des tâches et des missions entre les 2 laboratoires 6

C.1.2. Réseaux partenaires 7

C.2. MOYENS DONT DISPOSE LE LABORATOIRE COORDONATEUR ET LE LABORATOIRE ASSOCIE ET QUI SERAIENT AFFECTES AU CNR 8

C.2.1.Ressources humaines 8

C.2.3. Equipements 15

C.3. THEMATIQUES DE RECHERCHE DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR 17

C.3.1. Mécanismes de résistance aux antituberculeux 17

C.3.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez M. abscessus 19

C.3.3. Mécanismes de résistance aux antilépreux 20

C.4. CAPACITES TECHNIQUES ACTUELLES DANS LE DOMAINE DU CNR 21

C.4.1. Liste des techniques disponibles 21

C.4.2. Collections de souches de référence 23

D. BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES : 24

RAPPORT D'ACTIVITE DU CNR-MYRMA 2010, BILAN 2006-2010 24

D.1. ACTIVITES AU TITRE DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE 24

D.1.1. Evaluation de nouvelles techniques 24

D.1.2. Activités d'expertise pour les laboratoires français 31

D.1.3. Contrôles de qualité externe organisés par le CNR-MyRMA 46

D. 2. CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE OU A L'ALERTE 47

D.2.1. Activités de surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux anti-tuberculeux 47

D. 3. CONSEIL AUX PROFESSIONNELS OU AUX AUTORITES DE SANTE 69

D.3.1. Activités de conseil aux professionnels 69

D.3.2. Formation 70

D.3.3. Information 72

D.3.4. Activités d'expertises auprès des autorités sanitaires nationales et européennes 72

D.4. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN AVEC L'ACTIVITE DU CNR-MYRMA (SYNTHESE 2006-2010) 73

D.4.1. Chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries 73

D.4.2. Mécanismes de résistance chez les mycobactéries 74

E. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DU CNR-MYRMA 80

2006-2011 80

E.1. PUBLICATIONS NATIONALES 80

E.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES 81

E.3. COMMUNICATIONS NATIONALES 84

E.4. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES 86

E.5. CONFERENCES SUR INVITATIONS NATIONALES 87

E.6. CONFERENCES SUR INVITATIONS INTERNATIONALES 90

F. DEMARCHE QUALITE 91

G. INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE 93

ANNEXES 94

A. Fiche d'identité du laboratoire coordonateur et du laboratoire associé

Coordonnées du laboratoire candidat

Laboratoire candidat pour le Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA)

1. Laboratoire coordinateur

- Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

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

- Responsable scientifique : Pr Vincent JARLIER

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

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

2. Laboratoire associé

- Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène

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

- Responsable scientifique: Pr Emmanuelle CAMBAU

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

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

B. Présentation du contexte

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

Tuberculose

Malgré une régression très importante durant les dernières décennies, la tuberculose reste une infection fréquente dans les pays industrialisés. En France, l'incidence annuelle était en 2009 globalement **de 8 cas pour 100.000 habitants**, mais de 16 et 25 pour 100.000 habitants en Ile de France et à Paris, respectivement, soit au total 5276 cas déclarés à travers le système de notification obligatoire (source InVS). La tuberculose frappe essentiellement deux groupes de population en France : (a) les sujets âgés nés en France (surtout dans la tranche d'âge ≥ 70 ans) et (b) les sujets jeunes nés à l'étranger (surtout dans la tranche d'âge 20-44 ans). L'incidence de la tuberculose est beaucoup plus élevée (20 à 400 pour 100 000 habitants) dans les pays non industrialisés.
La résistance acquise aux antibiotiques joue un rôle essentiel dans la prise en charge de la tuberculose. Les mécanismes moléculaires de la résistance acquise chez *M.tuberculosis* complex sont des mutations dans les gènes chromosomiques. En raison du nombre élevé de cellules bactériennes dans les formes multibacillaires (formes pulmonaires excavées, $\geq 10^8$ bacilles) et de la proportion de mutants résistants présents au sein de la population bactérienne initialement sensible ou « sauvage » (1 bacille résistant pour 10^5 à 10^8 bacilles, selon les antituberculeux), il y a de 1 à 1000 bacilles résistants à chacun des antituberculeux présents dans les lésions en début du traitement. La tuberculose est l'infection-type qui expose au risque de sélection, sous traitement mal conçu ou mal conduit, de mutants résistants au sein de la population initialement sensible, cause de rechutes à bacilles résistants.
La résistance acquise aux antituberculeux limite les possibilités thérapeutiques, surtout en cas d'accumulation de résistance à l'isoniazide et à la rifampicine (« multirésistance ou MDR») et encore plus en cas de résistance supplémentaire aux fluoroquinolones et aux antituberculeux injectables autres que la streptomycine (amikacine, kanamycine, capréomycine) (« ultrarésistance ou XDR»). Dans ces cas, le succès thérapeutique est très compromis et les taux de mortalité sont élevés.
La fréquence de la tuberculose, sa gravité, son caractère contagieux, et le fait qu'il existe une vaccination capable de réduire l'incidence de la maladie (le BCG), en particulier des formes graves de l'enfant (méningite, miliaire), justifient le système de notification (signalement immédiat, géré par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), puis déclaration obligatoire « DO ») en vigueur en France. C'est sur ce système que repose l'essentiel la surveillance épidémiologique de la maladie. Le fait que les formes multibacillaires (c.a.d. les formes à examen microscopique positif) soient de loin les plus contagieuses, et que les formes à culture positive permettent d'identifier avec précision l'espèce mycobactérienne impliquée (*M.tuberculosis, M.bovis*…) et de procéder à des tests de sensibilité aux antituberculeux, justifie une surveillance bactériologique à partir des laboratoires. Parce qu'en France environ 200 laboratoires ont une activité de mycobactériologie, l'organisation en réseau est la meilleure solution pour la surveillance bactériologique.

Lèpre

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

Infections à mycobactéries atypiques

Les infections à mycobactéries atypiques sont importantes en raison de leur implication chez les immunodéprimés (ex. *M.avium* et SIDA), dans les infections iatrogènes (ex. *M.chelonae*, *M.xenopi*, *M.fortuitum*) et chez des sujets atteints d'affections respiratoires chroniques telles que la mucoviscidose (ex. *M.kansasii*, *M.fortuitum*, *M.xenopi*, *M.abscessus*).
Ces infections, dont le nombre est estimé à environ 500 cas par an en France posent de difficiles problèmes thérapeutiques en raison du tout petit nombre d'antibiotiques naturellement actifs et de la facilité avec laquelle on sélectionne in vivo sous traitement des mutants résistants aux rares antibiotiques actifs (exemple : clarithromycine et *M.avium*).
L'ulcère de Buruli est une mycobactériose particulière, émergente, causée par la seule mycobactérie productrice de toxine (*M.ulcerans*). C'est une infection grave de la peau et des tissus mous, succédant à une inoculation accidentelle à partir de réservoirs aquatiques. Cette maladie sévit dans des zones intertropicales (dont la Guyane) qui sont des zones d'attraction touristique. C'est pourquoi, malgré le faible nombre de cas en métropole, il faut y maintenir une expertise sur le plan diagnostic en raison des très longs délais de culture (2 à 3 mois) et des difficultés thérapeutiques.

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

De nombreux laboratoires qui n'ont pas un volume suffisant de demandes dans le domaine confient tout ou partie du travail à des laboratoires « sous-traitants ». Les laboratoires qui ont des activités de mycobactériologie (environ 200 en France en 2010, cf « réseaux partenaires ») identifient en général en leur sein des structures et des personnels qui sont consacrés à cette activité. Les nouvelles contraintes de sécurité (arrêté de juillet 2007) ont comme conséquences (a) une réduction progressive du nombre de laboratoires conservant une activité de mycobactériologie, du moins celles d'identification et de tests de sensibilité aux antibiotiques, et donc (b) une demande croissante d'expertise extérieure pour ces deux dernières activités.
Dans les CHU où l'activité de mycobactériologie est développée en raison de grands volumes de demandes et de la présence de bactériologistes spécialisés, des équipes compétentes sont en place. Le regroupement de ces équipes au sein du groupe universitaire **Azay-mycobactéries** permet un travail en réseau basé sur des méthodologies solides. Pour les autres laboratoires (centres hospitaliers Généraux, laboratoires privés…) moins experts en mycobactériologie, le travail en réseau (**réseau CNR-MyRMA**) a l'avantage de permettre un recueil exhaustif d'informations mais doit être basé sur des méthodologies adaptées au temps limité que ces laboratoires peuvent y consacrer.

Développements des techniques de mycobactériologie

Les **tests d'amplification génique** (TAG), très utiles pour la confirmation des cas de tuberculose à examen microscopique positif, ne sont pas encore satisfaisants pour le diagnostic de la tuberculose à examen microscopique négatif, en raison (a) d'un manque de sensibilité (faux négatifs) et (b) d'une proportion de faux positifs qui, bien que faible, aboutit à des valeurs prédictives positives trop basses quand les TAG sont appliqués à des patients chez lesquels la prévalence de la maladie est faible. De plus, les TAG ne sont pas fiables à ce jour pour le diagnostic des mycobactérioses. Il faudra donc (a) continuer à développer des tests plus performants et (b) mieux évaluer quelles sont les conditions d'application qui permettront d'obtenir des résultats utiles pour les prises de décision médicales (recherche bio-clinique).
Les tests génomiques destinés à **détecter les mutations conférant la résistance aux antituberculeux** ont fait l'objet de développements industriels récents. Les trousses proposées doivent être méticuleusement évaluées en terme de sensibilité et spécificité, mais aussi de valeurs prédictives en tenant compte de la prévalence de la résistance dans des situations épidémiologiques bien définies (nouveaux cas, rechutes, pays de naissance…). L'utilisation des tests génomiques étant délicate, il sera important de développer des **actions de formation**.
Les techniques de **génotypage** destinées (a) à étudier la phylogénie au sein des espèces mycobactériennes, en particulier *M.tuberculosis* et (b) à comparer les souches dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques (empreintes digitales génomiques) sont en plein développement. Les performances des techniques basées sur l'amplification et le séquençage, proposées pour remplacer les techniques traditionnelles basées sur la digestion-hybridation, devront être soigneusement évaluées.
Enfin, les tests diagnostiques basés sur **l'approche immunologique** (ex. IGRA) sont en plein développement et il faudra poursuivre leur évaluation dans des conditions de terrain.

C. Descriptif des capacités du laboratoire coordonateur et du laboratoire associé

C.1. Organisation proposée pour répondre aux exigences du cahier des charges

Pour répondre aux exigences du cahier des charges le laboratoire propose l'organisation suivante :

Un laboratoire coordinateur situé dans le laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière à Paris, dont Pr Vincent Jarlier est le reponsable.
Ce laboratoire a la maîtrise des techniques mycobactériologiques classiques et génotypiques, une longue expérience des antituberculeux (tests de sensibilité, mécanismes de résistance, chimiothérapie expérimentale, conseil thérapeutique), assure l'animation et la gestion de réseaux de laboratoires et a déjà établi des collaborations solides avec les structures en charge de la surveillance épidémiologique (InVS) et des décisions sanitaires (DGS, C-CLINs).

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

C.1.1. Répartition des tâches et des missions entre les 2 laboratoires

Au-delà de permettre une suppléance (continuité du service) pour les analyses d'expertise courante (mise en culture de prélèvements, identification de souches de mycobactérie, détection moléculaire de la résistance aux antituberculeux), qui peuvent être menées dans chacun des 2 laboratoires, les tâches et missions seront réparties entre ces laboratoires en fonction de leurs compétences spécifiques et de leur expérience acquise durant les 2 dernières mandatures du CNR-MyRMA :

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

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

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

Le laboratoire coordonateur dispose d'un vaste laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 qui lui permet de prendre en charge l'expertise concernant les cas de tuberculose en particulier pour les analyses nécessitant des subcultures de souches MDR et XDR. Le laboratoire associé est bien équipé pour les analyses de biologie moléculaire, la spectrométrie de masse et l'étude approfondie des mycobactéries atypiques. La mise au point et l'évaluation des nouvelles méthodes de laboratoires (cf. plus loin) suivront aussi cette dichotomie.
Le fait que les 2 laboratoires soient situés à Paris et appartiennent à la même institution (Assistance publique-Hôpitaux de Paris) facilite beaucoup la communication et les transports entre eux.

Le CNR-MyRMA a aussi besoin pour les activités de recherche et développement de nouvelles techniques **des structures de recherche labellisées** auxquelles il participe et qui sont décrites dans el §C.3.

C.1.2. Réseaux partenaires

La surveillance de certaines infections à mycobactéries et de leur résistance aux antibiotiques est réalisée par le CNR-MyRMA à travers 2 réseaux de partenaires, le réseau Azay-Mycobactéries et le réseau CNR-MyRMA.

Le réseau Azay-Mycobactéries

La surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux est basée sur la collaboration volontaire de laboratoires hospitalo-universitaires de Bactériologie, particulièrement impliqués en mycobactériologie et organisés en réseau (Groupe " Azay Mycobactéries ", animé jusqu'en 2010 par Jeanne Texier-Maugein – Bordeaux et depuis 2011 par Christian Martin - Limoges). Pour ses activités de surveillance de la résistance, le réseau est conjointement animé par le CNR-MyRMA.
La surveillance assurée à travers ce réseau est standardisée, en particulier pour ce qui est du recueil des informations cliniques et des résultats des épreuves de sensibilité aux antibiotiques de première ligne (isoniazide, rifampicine, streptomycine, éthambutol). Chaque laboratoire a comme responsabilité de recueillir pour chaque cas de tuberculose bactériologiquement confirmé (culture positive) les données suivantes, conformément aux recommandations l'OMS : âge, pays de naissance, co-infection par le VIH, localisation clinique de la tuberculose et antécédent de traitement antituberculeux.
Les données sont recueillies d'une manière continue depuis 1995 et transmises anonymement au CNR-MyRMA où elles sont validées puis analysées.

Le nombre de CHU participant au réseau Azay-Mycobactéries a doublé depuis 1995 : 15 en 1995, 23 en 2001, 27 en 2002, 33 en 2004 et 32 en 2006 et 35 en 2008. Le réseau couvre maintenant toutes les régions métropolitaines françaises sauf la Corse qui n'a pas de CHU. Le nombre total de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les laboratoires du réseau est de **l'ordre de 1500** par an, soit **près d'un tiers du total des cas** de tuberculose à culture positive identifiés en France.
La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis qui ont montré que la sensibilité du réseau est convenable (>95%), que la concordance des données avec celles de la DO et celles des dossiers des médicaux des cas est aussi convenable et, que les discordances observées ont un impact très faible sur les taux de résistance stratifiés par facteur de risque (antécédents de traitement, pays de naissance). Après corrections tenant compte de ces discordances, les taux corrigés contiennent sont très proches des taux observés par le réseau. Les résultats de ces travaux méthodologiques ont été publiés (Guérin-Tran, Eur J Epidemiol 2006 ; Khuê, Epidemiol Infect 2008).

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, avec l'aide d'environ 300 laboratoires correspondants (Réseau CNR-MyRMA), la surveillance annuelle du nombre de malades ayant une tuberculose bactériologiquement confirmée (culture positive) et, parmi ces malades, du nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine (cas de tuberculose à bacilles multirésistants ou MDR).
Ce réseau est aussi mis à contribution pour surveiller certaines formes particulières de tuberculose (méningites, *M. bovis*...).

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

Autres collaborations

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

C.2. Moyens dont dispose le laboratoire coordonateur et le laboratoire associé et qui seraient affectés au CNR

C.2.1.Ressources humaines

Les moyens affectés au CNR seront ceux :

- du laboratoire coordonnateur (Pitié-Salpêtrière, Paris)

- du laboratoire associé (Saint Louis-Lariboisière, Paris)

Curriculum vitae du responsable scientifique du laboratoire coordonateur : Pr Vincent Jarlier

JARLIER Vincent, Pascal
né en 1951 (Paris, France)

- Docteur en Médecine (Paris, 1977)
- Post-doctorat : Departement de Microbiologie et Immunologie, Pr. H. Nikaido, Univ. de Californie, Berkeley, USA (juin 1988-octobre 1989)
- Doctorat en Sciences (Paris, 1990)
- Service de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier et Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Paris, France :
  - Assistant, 1979 ; Maître de Conférences, 1986
  - Professeur, 1991 ; Chef de Service, 1996

Adresse :

Bactériologie-Hygiène	Téléphone :	01 42 16 20 70
Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière	Fax :	01 42 16 20 72
47, boulevard de l'Hôpital	e-mail :	vincent.jarlier@psl.aphp.fr
75651 Paris cedex 13		

Responsabilités techniques et scientifiques :

- Membre du "Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie" (CASFM)
- Directeur du Centre National de Référence pour la Surveillance des Infections à Mycobactéries et de leur Résistance aux Antituberculeux (depuis 1999)
- Délégué à la prévention des infections nosocomiales à la Direction de la Politique Médicale de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (depuis 2002)
- European Antibiotic Resistance Surveillance System (EARSS, programme de la Communauté Européenne, intégré à l'ECDC en 2010) : représentant pour la France depuis 2003, Steering Committee depuis 2005, Chairman depuis 2011.
- European Center for Disease Control (ECDC, Stockholm) : expert pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques depuis 2008.
- Coordinateur national de la surveillance des bactéries multirésistantes par les réseaux inter-régionnaux dans le cadre du RAISIN (Réseau Alerte Investigation-Surveillance des Infections Nosocomiales, Institut de Veille Sanitaire) depuis sa création en 1999.
- Fondateur et responsable du Réseau de surveillance de la résistance aux antibiotiques dans les hôpitaux universitaires (« réseau AZAY-résistance »), financé par la Fondation pour la Recherche Médicale.

Contrats de recherche dans le domaine :

- OMS, 1989-1990 : résistance aux antibiotiques chez les mycobactéries
- Délégation à la recherche clinique de l'AP-HP, 1995 : diagnostic de la tuberculose
- ANRS, 1993-1995 : résistance aux antibiotiques chez les mycobactéries
- Association Claude Bernard : Formation associée 1993-1998 (Résistance aux antibiotiques chez les mycobactéries)

- INSERM (CRI, puis EMI, puis équipe INSERM), en collaboration avec le Pr L. Gutmann dans le cadre du Laboratoire de Recherche Moléculaire sur les Antibiotiques (LRMA, responsable E. Collatz puis M. Arthur, Université Paris VI), depuis 1995.
- MENRT : équipe accueil EA 1541 : Recherche expérimentale, épidémiologique et moléculaire sur la résistance aux antibiotiques, centré sur chez les mycobactéries, depuis 1998.
- Association R. Follereau : chimiothérapie des infections mycobactéries, depuis 1989

Principales publications dans le domaine :

- Permeability barrier toward hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonei*. V. JARLIER, H. NIKAIDO. J. Bacteriol. 1990, 172 : 1418-1423.
- Interplay between of cell wall barrier and ß-lactamase activity determines high resistance to ß-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. V. JARLIER, L. GUTMANN, H. NIKAIDO. Antimicrob. Agents Chemother. 1991, 35 : 1937-1939.
- Porins in the cell wall of mycobacteria. J. TRIAS, V. JARLIER, R. BENZ. Science. 1992 , 258 : 1479-1481.
- Selection of *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. E. CAMBAU, W. SOUGAKOFF, M. BESSON, C. TRUFFOT-PERNOT, J. GROSSET, V. JARLIER. J. Infect. Dis. 1994, 170 : 479-483.
- Sequence analysis purification and study of inhibition by 4-quinolones of the DNA gyrase from *Mycobacterium smegmatis*. V. REVEL-VIRAVAU, Q.C. TRUONG, N. MOREAU, V. JARLIER, W. SOUGAKOFF. Antimicrob. Agents Chemother. 1996 ; 40 : 2054-2061.
- Nosocomial transmission of tuberculosis among mentally-handicapped patients in a long-term care facility. N. LEMAITRE, W. SOUGAKOFF, D. COETMEUR, J. VAUCEL, V. JARLIER, J. GROSSET. Int. Tub. Lung Dis. 1996 ; 77 : 531-536.
- Non-radioactive single-strand conformation polymorphism analysis for detection of fluoroquinolone resistance in mycobacteria. W. SOUGAKOFF, N. LEMAITRE, E. CAMBAU, M. SZPYTMA, V. REVEL, V. JARLIER. Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 1997 ; 16 : 395-398.
- Use of DNA fingerprinting for primary surveillance of nosocomial tuberculosis in a large urban hospital: detection of outbreaks in homeless people and migrant workers. N. LEMAITRE, W. SOUGAKOFF, C. TRUFFOT-PERNOT, E. CAMBAU, J.P. DERENNE, F. BRICAIRE, J. GROSSET, V. JARLIER. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 1998 ; 2 : 390-396.
- *Mycobacterium avium* complex. Common-source or cross-infection in AIDS patients attending the same day-care facility. CARBONNE, N. LEMAITRE, M. BOCHET, C. TRUFFOT-PERNOT, C. KATLAMA, J. GROSSET, F. BRICAIRE, V. JARLIER. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 1998 ; 19 : 784-786.
- Evaluation of the new MB Redox system for detection of growth of mycobacteria. E. CAMBAU, C. WICHLACZ, C. TRUFFOT-PERNOT, V. JARLIER. J. Clin. Microbiol. 1999 ; 37 : 2013-2015.
- Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA. N. LEMAITRE, W. SOUGAKOFF, C. TRUFFOT-PERNOT, V. JARLIER. Antimicrob. Agents Chemother. 1999 ; 43 : 1761-1763.
- Purification and inhibition by quinolones of DNA gyrases from *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium fortuitum* biov. *Peregrinum*. GUILLEMIN, W. SOUGAKOFF, E. CAMBAU, V. REVEL-VIRAVAU, N. MOREAU, V. JARLIER. Microbiology 1999 ; 145 : 2527-2532.
- Mycobacterial growth indicator tube versus the proportion method on löwenstein-Jensen medium for antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. E. CAMBAU, C. TRUFFOT-PERNOT, F. BOULAHBAL, C. WICHLACZ, J. GROSSET, V. JARLIER. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2000 ; 19 : 938-942.
- Multidrug-resistant tuberculosis : eight years of surveillance in France. J. ROBERT, D. TRYSTRAM, C. TRUFFOT-PERNOT, V. JARLIER. Eur. Respir. J. 2003 ; 22 : 833-837.
- Growth on blood agar discriminates Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare. M. DRANCOURT, M.J. GEVAUDAN, C. TRUFFOT, V. JARLIER. Clin Microbiol Infect. 2003 Oct ; 9 (10) : 1028-30.
- Use of a high density DNA probe array for detecting mutations involved in rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* W. SOUGAKOFF, M. RODRIGUE, C. TRUFFOT-PERNOT, M. RENARD, N. DURIN, M. SZPYTMA, R. VACHON, A. TROESCH, V. JARLIER. Clin Microbiol Infect. 2004 ; 10 : 289-294.
- A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. K. ANDRIES, P. VERHASSELT, PJ. GUILLEMONT, HW GOHLMANN, JM NEEFS, H. WINKLER, J. VAN GESTEL, P. TIMMERMANN, E. ZHU M. LEE, P. WILLIAMS, D. de CHAFFOY, E. HUITRIC, S. HOFFNER, E. CAMBAU, C. TRUFFOT-PERNOT, N. LOUNIS, V. JARLIER. Science 2005 ; 307 : 223-227.
- Efficient intermittent rifapentine-moxifloxacin-containing short-course regimen for treatment of tuberculosis in mice. N. VEZIRIS, N. LOUNIS, A. CHAUFFOUR, C. TRUFFOT-PERNOT, V. JARLIER. Antimicrob Agents Chemother. 2005 ; 49(10) : 4015-9.
- Dihydropteroate synthase mutations in the *folP1* gene predict dapsone resistance in relapsed cases of leprosy. E. CAMBAU, L. CARTHAGENA, A. CHAUFFOUR, B. JI, V. JARLIER. Clin Infect Dis. 2006 ; 42 : 238-241.
- Bactericidal Activities of R207910 and Other Newer Antimicrobial Agents against *Mycobacterium leprae* in Mice. JI, A. CHAUFFOUR, K. ANDRIES, V. JARLIER. Antimicrob. Agents Chemother 2006 ; 50 : 1921-6
- Combinations of R207910 with drugs used to treat multidrug-resistant tuberculosis have the potential to shorten treatment duration. N. LOUNIS, N. VEZIRIS, A. CHAUFFOUR, C. TRUFFOT-PERNOT, K. ANDRIES, V. JARLIER Antimicrob. Agents Chemother 2006 ; 50 : 3543-7
- Orally administered combined regimens for treatment of Mycobacterium ulcerans infection in mice. JI, A. CHAUFFOUR, J. ROBERT, S. LEFRANÇOIS, V. JARLIER Antimicrob. Agents Chemother. 2007 ; 51 : 3737-9
- Molecular characterisation of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolated from new cases in Lagunes region (Côte d'Ivoire). K.R. N'GUESSAN, M. DOSSO, E. EKAZA, J. KOUAKOU, V. JARLIER Int. J. Antimicrob. Agents. 2008 ; 31 : 498-500
- Performance of MTBDR plus for detecting high/low levels of Mycobacterium tuberculosis resistance to isoniazid. F. BROSSIER, N. VEZIRIS, V. JARLIER, W. SOUGAKOFF Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2009 ; 13 : 260-5

- Impacts of dosing frequency of the combination rifampin-streptomycin on its bactericidal and sterilizing activities against Mycobacterium ulcerans in mice. B. JI, A. CHAUFFOUR, A. AUBRY, J. ROBERT, M. IBRAHIM, V. JARLIER Antimicrob Agents Chemother. 2009 ; 53 : 2955-9
- Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates. F. BROSSIER, N. VEZIRIS, V. JARLIER, W. SOUGAKOFF. J. Clin. Microbiol. 2010 ; 48 : 1683-9
- Identification and genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex species by use of a SNaPshot Minisequencing-based assay. BOUAKAZE, C. KEYSER, S.J. DE MARTINO, W. SOUGAKOFF, N. VEZIRIS, H. DABERNAT, B. LUDES. J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1758-66. Epub 2010 Mar 10.
- Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. J. PITON, S. PETRELLA, M. DELARUE, G. ANDRE-LEROUX, V. JARLIER, A. AUBRY, C. MAYER. PlosOne 2010 ; 5(8) : e12245.
- Should moxifloxacin be used for the treatment of XDR-TB? An answer from the murine model. J. POISSY, A. AUBRY, C. FERNANDEZ, M-C. LOTT, A. CHAUFFOUR, V. JARLIER, R. FARINOTTI, N. VEZIRIS. Antimicrob Agents Chemother. 2010 ; 54(11) : 4765-71.
- Sterilizing Activity of Second-Line Regimens Containing TMC207 in a Murine Model of Tuberculosis. N. VEZIRIS, M. IBRAHIM, N. LOUNIS, K. ANDRIES, V. JARLIER PLoS ONE 2011; 6(3): e17556.
- Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the Mycobacterium abscessus group by erm(41) and rrl sequencing. S. BASTIAN, N. VEZIRIS, A.L. ROUX, F. BROSSIER, J.L. GAILLARD, V. JARLIER, E. CAMBAU Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):775-81. Epub 2010 Dec 6.
- Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. BROSSIER, N. VEZIRIS, C. TRUFFOT-PERNOT, V. JARLIER, W. SOUGAKOFF. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jan;55(1):355-60. Epub 2010 Oct 25.

Curriculum vitae du responsable scientifique du laboratoire associé : Pr Emmanuelle Cambau

CAMBAU Emmanuelle
née en 1960 (Chambéry, France)

Adresse professionnelle :

Bactériologie
Hôpital Lariboisière
2, rue Ambroise Paré
75010 Paris

Téléphone : 01 49 95 65 54
Fax : 01 49 95 85 37
e-mail : emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr

Diplômes :

- Docteur en Médecine (Paris, 1990). Interne desHôpitaux d'Ile de France, Filière Biologie Médicale
- Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale (D.E.S.), Paris 7, 1991
- Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales (M.S.B.M.) en Pharmacologie, 1989.
- Diplôme de Bactériologie Médicale de l'Institut Pasteur, 1989
- Doctorat en Sciences (Paris, 1995)
- Post-doctorat : Département de Biochimie et biologie cellulaire, Pr. M. Fisher, Université de Saint Georges, Londres, UK (1998)
- Diplôme d'Etudes Spécialisées Complémentaires (D.E.S.C.), Biologie des agents infectieux (Paris, 1991)
- Diplôme Inter-universitaire de Pédagogie Médicale (Paris, 2003).
- Habilitation à diriger les recherches (H.D.R.), (Paris, 2001)
- Prix Biomérieux (2001) pour l'ensemble des travaux sur le « Diagnostic de la résistance aux antibiotiques »

Fonctions hospitalo-universitaires :

- Assistant Hospitalo-Universitaire, 1990, Paris6
- Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, 1995, Paris6
- Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, 2004, Paris12
- Chef de Service, 2010, Service de Bactériologie, Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière, UFR de Médecine Paris Diderot, Université Paris Diderot- Paris7

Responsabilités techniques et scientifiques :

- Directeur du laboratoire associé du Centre National de Référence des « Mycobactéries et de la Résistance des mycobactéries aux antituberculeux » (CNR-MyrMA), depuis 2006

- Responsable du groupe « Juste prescription des examens en Bactériologie-Virologie-Hygiène » pour l'AP-HP et membre du comité central de la juste prescription des examens biologiques (Président Pr Robin Dhote)
- Board-member of the Professional affairs Committee of the European Society for Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)
- Board-member of the European Surveillance Group on Antibiotic Resistance (ESGAR) of the European Society for Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)
- Membre du Groupe de travail sur les médicaments anti-infectieux à la Direction de l'Evaluation des médicaments et des produits biologiques de l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) depuis 2007
- Organisation Mondiale de la Santé, Global Leprosy Program : membre expert du réseau sur la surveillance de la résistance dans la lèpre depuis 2008
- Membre du Comité de suivi du Plan national « Tuberculose » 2008-2009, groupe « réduire les disparités en matières de tuberculose »
- Membre du réseau des laboratories de Référence en Tuberculose ERL-NET TB- ECDC depuis 2009
- Vice-président de la Société Française de Microbiologie depuis 2010

Activités et contrats de recherche dans le domaine :

- UPRES EA 1541 « Recherche expérimentale, épidémiologique et moléculaire sur la résistance aux antibiotiques », Paris VI (Directeur : Pr V. Jarlier), Laboratoire de Bactériologie-Hygiène (Pr J. Grosset, puis Pr V. Jarlier), Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie. 1994-2004
- Association Française Raoul Follereau : grant annuel pour les travaux de recherche sur la lèpre depuis 1995
- Communauté Européenne, Détection moléculaire de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux (BMH4-CT97-2339), 1997-1999. Six laboratoires européens associés, coordinateur: H. Rinder, Munich
- Association Claude Bernard : Unité Mycobactéries et Antibiotiques » Laboratoire de Bactériologie-Hygiène (Pr V. Jarlier), Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie. création et renouvellement quadriennal 1993-2000
- Equipe INSERM EMI 0004 (puis U655): Laboratoire de Recherche Moléculaire sur les Antibiotiques, Directeur : Dr E. Collatz, puis M. Arthur, CRI 1995-1999 puis EMI 2001-2004
- Institut Fédératif de Recherche (I.F.R.) n°10 « Institut Mondor de Médecine Moléculaire », CHU Henri Mondor, Paris 12, Equipe « Aspects épidémiologiques et moléculaires de la résistance aux quinolones », 2005-2008
- Equipe de recherche EA3964 « Emergence in vivo de la résistance » (Directeur B. Fantin), Université Paris Diderot, depuis 2009
- Ordre de Malte, appel d'offres MAGRALEPRE 2006-2008 : Nouveau test pour la détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez *Mycobacterium leprae*
- Association Vaincre la Mucoviscidose 2009 : « bases du traitement des infections à *Mycobacterium abscessus* : identification des marqueurs de résistance et étude expérimentale chez la souris » en partenariat avec EA 1541 (Paris 6, Pr V. Jarlier) et EA 3647 « Physiopathologie et diagnostic des infections microbiennes » (Versailles-Saint Quentin en Yvelines, Pr JL Gaillard)

Encadrement dans le domaine :

- 8 étudiants en master2
- 2 étudiants en Thèse de Sciences

Collaborations et réseaux :

- Laboratoire de Biochimie (Pr L. Mark Fisher), Département de Biologie cellulaire et moléculaire, Faculté de Médecine de l'hôpital St Georges, Université de Londres, Royaume-Uni, depuis 1994
- PIREN-Seine (Programme interdisciplinaire de Recherche sur l'environnement de la Seine) projet « AQUAMYC », détection des mycobactéries non tuberculeuses dans les environnements aquatiques urbains, en collaboration avec F. Lucas (CEREVE, UMR MA102, Paris 12 et CRECEP), 2006-2010.

- OMS, Global Leprosy Program, réseau de surveillance de la résistance secondaire aux antilépreux : début en 2008
- Organisation du 2er Workshop OMS en novembre 2009 à Paris, Hôpital Saint Louis

Revue de 70 articles pour des revues internationales **et de** 20 projets soumis à des demandes de crédits publics

Principales publications dans le domaine :

- Cambau E, Sougakoff W, Besson M, Truffot-Pernot C, Grosset J, Jarlier V. Selection of a gyrA mutant of Mycobacterium tuberculosis resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J Infect Dis* 1994;170(5):1351.
- Cambau E, Sougakoff W, Besson M, Truffot-Pernot C, Grosset J, Jarlier V. Selection of a gyrA mutant of Mycobacterium tuberculosis resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J Infect Dis* 1994;170(2):479-83.
- Cambau E, Sougakoff W, Jarlier V. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the gyrA gene of mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1994;116(1):49-54.
- Revel V, Cambau E, Jarlier V, Sougakoff W. Characterization of mutations in Mycobacterium smegmatis involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(9):1991-6.
- Bournerias I, Truffot C, Cambau E. Infections cutanées à mycobactéries atypiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale Dermatologie, 1996. 12-510-B-10.
- Cambau E, Jarlier V. Resistance to quinolones in mycobacteria. *Res Microbiol* 1996;147(1-2):52-9.
- Cambau E, Perani E, Guillemin I, Jamet P, Ji B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in Mycobacterium leprae. *Lancet* 1997;349(9045):103-4.
- Truffot-Pernot C, Cambau E. Mycobactéries : caractéristiques et identification In « Traité de Médecine Interne », Pr J. Godeau, Ed Médecine-Sciences, Flammarion, 1997, p. 891-893.
- Cambau E, Jarlier V. Résistance des mycobactéries aux antibiotiques In Les résistance bactériennes en Pédiatrie, Aujard Y, Gendrel D, Raymond J, Bingen E, Ed Médecine -Sciences, Flammarion, 1997, p.85-90.
- Guillemin I, Jarlier V, Cambau E. Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(8):2084-8.
- Jouveshomme S, Cambau E, Trystram D, Szpytma M, Sougakoff W, Derenne JP, et al. Clinical utility of an amplification test based on ligase chain reaction in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(4):1096-101.
- Cambau E, Lemaitre N. 1998. Mécanismes de résistance aux antituberculeux chez *Mycobacterium tuberculosis*. In Recherche clinique et thérapeutique, "Les médicaments de la tuberculose chez l'enfant", G. Pons, D. Gendrel et J. Grosset, Ed Springer-Verlag, p: 85-97.
- Guillemin I, Sougakoff W, Cambau E, Revel-Viravau V, Moreau N, Jarlier V. Purification and inhibition by quinolones of DNA gyrases from Mycobacterium avium, Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium fortuitum bv. peregrinum. *Microbiology* 1999;145 (Pt 9):2527-32.
- Aubry A, Jarlier V, Escolano S, Truffot-Pernot C, Cambau E. Antibiotic susceptibility pattern of Mycobacterium marinum. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(11):3133-6.
- Grosset J, Truffot C, Cambau E. Bacteriology of tuberculosis. In “Tuberculosis : a comprehensive approach”, E. Hershfield and LB Reichman, Ed Marcel Dekker, 2000, pp.157-185.
- Cambau E, Truffot-Pernot C, Boulahbal F, Wichlacz C, Grosset J, Jarlier V. Mycobacterial growth indicator tube versus the proportion method on Lowenstein-Jensen medium for antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(12):938-42.
- Aubry A, Chosidow O, Caumes E, Robert J, Cambau E. Sixty-three cases of Mycobacterium marinum infection: clinical features, treatment, and antibiotic susceptibility of causative isolates. *Arch Intern Med* 2002;162(15):1746-52.
- Cambau E, Bonnafous P, Perani E, Sougakoff W, Ji B, Jarlier V. Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy. *Clin Infect Dis* 2002;34(1):39-45.
- Dauendorffer JN, Guillemin I, Aubry A, Truffot-Pernot C, Sougakoff W, Jarlier V, Cambau E. Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase genes. *J Clin Microbiol* 2003;41(3):1311-5.
- Aubry A, Pan XS, Fisher LM, Jarlier V, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(4):1281-8.
- Jarlier V, Cambau E, Sougakoff W. [What are the new diagnostic tools in tuberculosis? What is their role in disease management and what are their indications? Gene amplification tests]. *Rev Mal Respir* 2004;21(3 Pt 2):S36-43.
- Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Gohlmann HW, Neefs JM, Winkler H, Gestel JV, Timmermann P, Zhu M, Lee E, Williams P, de Chaffoy D, Huitric E, Hoffner S, Cambau E, Truffot-Pernot C, Lounis N, and Jarlier V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science 2005, 307(5707) : 223-227
- Veziris N, Cambau E, Sougakoff W, Robert J, Jarlier V. [Resistance to antituberculous drugs]. *Arch Pediatr* 2005;12 Suppl 2:S102-9.
- Aubry A, Fisher LM, Jarlier V, Cambau E. First functional characterization of a singly expressed bacterial type II topoisomerase: the enzyme from Mycobacterium tuberculosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348(1):158-65.
- Aubry A, Veziris N, Cambau E, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Fisher LM. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(1):104-12.
- Cambau E, Carthagena L, Chauffour A, Ji B, Jarlier V. Dihydropteroate synthase mutations in the *folP1* gene predict dapsone resistance in relapsed cases of leprosy. *Clin Infect Dis* 2006;42(2):238-41.
- Cambau E, Truffot-Pernot C, Aubry A, Trystram D, Jarlier V. Diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries atypiques. Encyclopédie médico-biologique, 2006, Editions Elsevier
- Petrella S, Cambau E, Chauffour A, Andries K, Jarlier V, Sougakoff W. Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(8):2853-6.

- Matrat S, Petrella S, Cambau E, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Expression and purification of an active form of the Mycobacterium leprae DNA gyrase and its inhibition by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(5):1643-8.
- Matrat S, Aubry A, Mayer C, Jarlier V, Cambau E. Mutagenesis in the alpha3alpha4 GyrA helix and in the Toprim domain of GyrB refines the contribution of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase to intrinsic resistance to quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(8):2909-14.
- Matrat S, Cambau E, Jarlier V, Aubry A. Are all the DNA gyrase mutations found in Mycobacterium leprae clinical strains involved in resistance to fluoroquinolones? *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(2):745-7.
- Merens A, Matrat S, Aubry A, Lascols C, Jarlier V, Soussy CJ, Cavallo JD, Cambau E. The pentapeptide repeat proteins MfpAMt and QnrB4 exhibit opposite effects on DNA gyrase catalytic reactions and on the ternary gyrase-DNA-quinolone complex. *J Bacteriol* 2009;191(5):1587-94.
- Regnier S, Cambau E, Meningaud JP, Guihot A, Deforges L, Carbonne A, et al. Clinical management of rapidly growing mycobacterial cutaneous infections in patients after mesotherapy. *Clin Infect Dis* 2009;49(9):1358-64.
- Arnaud L, Cambau E, Brocheriou I, Koskas F, Kieffer E, Piette JC, Amoura Z. Absence of Mycobacterium tuberculosis in arterial lesions from patients with Takayasu's arteritis. J Rheumatol. 2009 Aug;36(8):1682-5.
- Carbonne A, Brossier F, Arnaud I, Bougmiza I, Caumes E, Meningaud JP, Dubrou S, Jarlier V, Cambau E, Astagneau P. Outbreak of nontuberculous mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. J Clin Microbiol. 2009 Jun;47(6):1961-4.
- Radomski N, Cambau E, Moulin L, Haenn S, Moilleron R, Lucas FS.Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. Appl Environ Microbiol 2010, 76:3514-20.
- Radomski N, Lucas FS, Moilleron R, Cambau E, Haenn S, Moulin L. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of Mycobacterium spp. in surface water. Appl Environ Microbiol. 2010 Nov;76(21):7348-51.
- Cambau E, Aubry A. *Mycobacterium marinum* - In "Tuberculosis and mycobacterial infections", Ed. D. Schlossberg, ASM Press, 2011.
- Bastian S, Veziris N, Roux AL, Brossier F, Gaillard JL, Jarlier V, Cambau E. Assessment of Clarithromycin Susceptibility in Strains Belonging to the *Mycobacterium abscessus* Group by *erm(41)* and *rrl* Sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):775-81.
- Macheras E, Roux AL, Bastian S, Leão SC, Palaci M, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Richter E, Rüsch-Gerdes S, Pfyffer G, Bodmer T, Cambau E, Gaillard JL, Heym B. Multilocus sequence analysis and *rpoB* sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):491-9.
- Cribier, B., A. Aubry, E. Caumes, E. Cambau, V. Jarlier, and O. Chosidow. [Histopathological study of *Mycobacterium marinum* infection]. Ann Dermatol Venereol 2011; 138:17-22.

Autres personnes impliquées dans le travail du CNR-MyRMA

Les personnes présentées dans l'organigramme ci-dessous et listées dans le tableau des emplois (joint dans le dossier adminsitratif) ont contribué au travail mené au CNR-MyRMA durant la mandature 2006-2011. Ces personnes couvrent les domaines de compétence requis par le cahier des charges : mycobactériologie, antibiotiques antituberculeux, mécanismes de résistance, biologie moléculaire, pneumologie, léprologie, chimiothérapie expérimentale, gestion de réseaux, méthodologie statistique.

Laboratoire coordonnateur Pitié-Salpêtrière

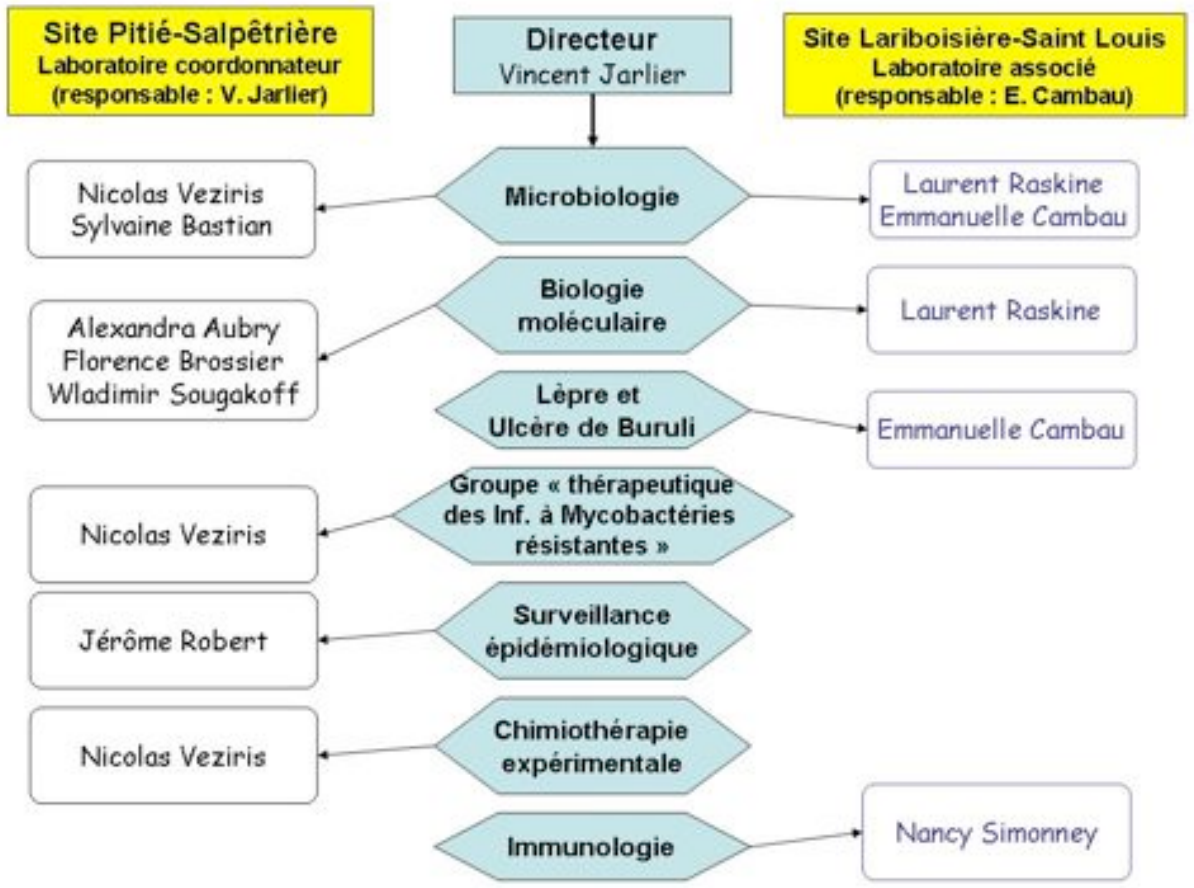
- 4 Médecins hospitaliers ou hospitalo-universitaires (temps partiels) du service de Bactériologie-Hygiène du grouep Hospitalier Pitié-Salpêtrière (AP-HP) et Université Pierre et Marie Curie
- **1 médecin contractuel (PHC, 1ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **2 Techniciens financés par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (2 ETP)**
- 2 Techniciens (temps partiels, financement AP-HP)
- 1 Secrétaire (temps partiel, financement AP-HP)
- 1 Technicien de recherche en chimiothérapie expérimentale (financement fonds associatifs)
- 1 Technicien de recherche en biologie moléculaire (financement Université Paris 6)
- 1 Animalier (financement fonds associatifs)

Laboratoire associé Saint Louis-Lariboisière

- 3 Médecins hospitaliers ou hospitalo-universitaires (temps partiels)
- 2 Technicien (temps partiels, financement AP-HP)
- 1 Secrétaire (temps partiel, financement AP-HP)

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

Organigramme du CNR-MyRMA



C.2.2. Locaux

Laboratoire coordinateur

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, 2e étage du bâtiment de la Pharmacie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, superficie totale du laboratoire 1000 m^2.
Les activités se déroulent :
- dans le laboratoire de sécurité P3 (150 m^2) consacré à la mycobactériologie (et aux alertes Biotox).
- dans les pièces adjacentes consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie fluorescente) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage…).

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

Laboratoire associé

Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal, site Lariboisière, situé au 2éme étage du bâtiment CIVIALE, superficie totale du laboratoire de 964 m2.
Les activités du CNR se déroulent :
- dans un laboratoire de sécurité consacré à la mycobactériologie (26 m2). Ce local va être abandonné au profit d'un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 qui sera implantée en 2011 sous la forme d'une construction modulaire à l'extérieur du bâtiment Civiale.
- dans des pièces (39 m2) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (microscopie), de leur contenu génétique (biologie moléculaire : identification, détection de mutation...) après inactivation : laboratoire de biologie moléculaire et laboratoire de microscopie fluorescente.

C.2.3. Equipements

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

Laboratoire de sécurité L3
- équipements pour le traitement des prélèvements médicaux, cultures en milieux solides et liquides,
- équipements pour antibiogrammes en milieu solide et liquide,
- équipements pour l'identification phénotypique classique,
- équipement pour l'extraction d'acides nucléiques (cf. ci-dessous),
- 5 postes de sécurité microbiologiques,
- 6 incubateurs,
- automate de culture en milieu liquide.
- caméra de lecture de plaque sensititre et logiciel de lecture et d'interprétation VIZION®
- microscopes à fluorescence lampe vapeur de mercure et lampe LED, microscopes classiques,
- sorbonne pour la coloration de Ziehl-Neelsen
- coagulateur pour la préparation des milieux de Lowenstein-Jensen

Biologie moléculaire
- extracteur d'acide nucléique de sécurité (pression négative) Roche MagNA Pure,
- extracteur d'acide nucléique automatisé QIAcube (QUIAGEN)
- 2 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Biorad iCycler, Biorad DNAEngine),
- 2 amplificateurs automatisés pour PCR « en temps réel » (MJResearch PTC-200, ABI7000),
- matériel d'hybridation manuel TwinCubator pour les bandelettes Hain,
- automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain,
- séquenceurs ADN : un monocapillaire ABI 310 (dans le laboratoire) ; un 16 capillaires ABI (sur plateforme de site dédiée aux analyses de biologie moléculaire),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé Biorad CEF-DR2,
- logiciel Gel Compar pour l'analyse des profils de génotypage,

- 1 imageur Biorad Chemidoc-XRS pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV et des membranes d'hybridation en chimioluminocence,
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques Pharmacia Gene Quant II,
- matériel d'hybridation/lecture Accuprobe (BioMérieux)

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

Animalerie (capacité totale : 2000 à 2500 souris) :
- 4 isolateurs rigides et 8 armoires pour maintenance des animaux infectés en pression négative,
- 4 isolateurs souples pour maintenance des animaux immunodéficients.
- 2 postes de sécurité microbiologique pour les dissections et cultures,
- 4 étuves,
- autoclave pour destruction des déchets.
- accès à l'animalerie A3 de la faculté de médecine Pierre-et-Marie Curie

Laboratoire associé (Groupe hospitalier St Louis-Lariboisière)

Laboratoire de sécurité L3 (mobile) (30m2)
- Equipement pour le traitement des échantillons médicaux
- 3 postes de sécurité microbiologique
- 3 incubateurs (30 et 37°C) pour milieux solides et liquides
- 2 automates de culture en milieu liquide (BD) et 1 module Hémoculture Mycobactérie (Mérieux)
- Équipement complet de mycobactériologie médicale classique (réactifs de décontamination, centrifugeuses, coloration auramine et Ziehl, microscopes à fluorescence…)
- Matériel et équipement pour identification rapide phénotypique
- Equipement pour antibiogramme en milieu liquide
- 1 automate pour antibiogramme en milieu liquide
- 1 module de suivi et d'analyse de la sensibilité des isolats aux antituberculeux de 1ere 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 (Heliosγ 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

Autres équipements
- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex Bruker)

- Automate d'immuno-analyse ETIMAX2000, pour le dosage d'interféron gamma par le test Quantiféron® Gold in Tube (Cellestis)
- 1 autoclave de destruction

C.3. Thématiques de recherche dans le domaine d'expertise du CNR

Les activités de recherche du CNR-MyRMA sont adossées à des structures de recherche labellisées :

- pour le laboratoire coordonateur : Université Pierre et Marie Curie (ER5, EA1541, directeur Pr Vincent JARLIER) « infections à mycobactéries (tuberculose, lèpre, mycobactérioses) et antibiotiques : aspects moléculaires, thérapeutiques et épidémiologiques », UFR Médecine Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, 91 boulevard de l'hôpital, 75634 Paris cedex 13.
- pour le laboratoire associé : Université Paris Diderot - Paris 7, PRES Paris-Sorbonne (EA 3964, directeur Pr Bruno FANTIN), «Emergence de la résistance bactérienne in vivo », U.F.R. de Médecine, site Xavier Bichat, 16, rue Henri Huchard, B.P. 416, 75877 PARIS Cedex 18

C.3.1. Mécanismes de résistance aux antituberculeux

Etude structurale et biochimique des enzymes impliquées dans l'activité des antituberculeux : KatG (résistance à l'INH) et PncA (résistance au pyrazinamide) chez M.tuberculosis

Catalase-peroxydase KatG et résistance à l'INH

Dans le cadre de l'évaluation de tests moléculaires (Genotype MTBDR®) destinés à la détection rapide de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide chez *M.tuberculosis*, nous avons établi que ~10% des souches cliniques résistantes à l'INH ne portaient pas les principales mutations décrites (e.g. S315T dans la **catalase-peroxydase KatG** et -15 c->t dans le **promoteur du gène *inhA***) et avons identifié de nouvelles mutations dans KatG pour lesquelles l'effet sur l'activité de l'enzyme et la résistance à l'INH est inconnu. Afin d'établir le rôle que joue chacune de ces mutations dans la résistance à l'INH, nous avons entrepris un programme d'étude enzymatique et structurale de la protéine KatG.

L'analyse structurale, basée sur la modélisation à partir de la structure cristallographique connue de la protéine KatG de *M.tuberculosis*, révèle qu'il existe plusieurs sites pouvant jouer un rôle clé dans la fixation de l'INH (proche du résidu S315) et dans l'activité catalasique et l'activité de transformation de l'INH (prodrogue) en radical actif INH·. L'étude enzymatique de mutants de KatG confirme que les mutations «à impact inconnu » qui touchent ces sites altèrent très fortement les activités catalasique et de formation du radical INH·. Ces sites appartiennent donc très vraisemblablement à la machinerie mise en œuvre par KatG pour activer l'INH. L'activité peroxydase semble en revanche peu affectée par les mutations de ces sites et pourrait faire intervenir d'autres sites/voies catalytiques.

D'autres mutations, très éloignées du site catalytique, ont également été caractérisées et agissent probablement en perturbant la stabilité globale de la protéine KatG. Enfin, quelques mutations n'ont pas d'effet sur l'activité de KatG, ni sur sa structure 3D et correspondent en fait probablement à des polymorphismes phénotypiquement silencieux spécifiques de certaines lignées phylogénétiques.

Ces différents travaux, qui représentent une première base pour l'interprétation de « l'antibiogramme moléculaire » par séquençage de *katG* » doivent être poursuivis dasn l'objectif à termes de prédire l'effet des mutations de KatG sur le phénotype de sensibilité des souches cliniques à l'INH.

Deux axes seront prioritairement suivis : (i) poursuivre la caractérisation biochimique des nouvelles mutations de KatG détectées en routine dans les souches reçues au CNR-MyRMA ; (2) compléter l'étude du mécanisme catalytique de KatG afin de mieux prédire l'effet des mutations détectées.

Pyrazinamidase PncA et résistance au pyrazinamide

Le pyrazinamide (PZA) est un antituberculeux de 1ère ligne pour lequel l'identification phénotypique et génotypique de la résistance reste très incertaine. A ce jour, il n'existe plus de milieu solide commercialisé et l'emploi des milieux liquides est hasardeux pour tester le PZA. Le CNR-MyRMA se

base sur le séquençage du gène *pncA* pour évaluer la sensibilité au PZA ce qui n'est pas pleinement satisfaisant en raison (i) de la très grande diversité des mutations trouvées dans *pncA*, (ii) d'un nombre élevé de mutations non décrites que l'on ne peut pas interpréter de façon univoque, et (iii) de l'existence d'un nombre significatif de mutations pour lesquelles l'effet sur PncA semble négligeable et n'entraine pas de résistance au PZA.
Dans le but d'établir les relations entre la structure de la pyrazinamidase (PncA), son activité enzymatique et la résistance au pyrazinamide, nous avions entrepris au cours de la mandature précédente de déterminer la structure tridimensionnelle de PncA de *M. tuberculosis*. Nos résultats publiés début 2011 (Petrella, PLoS One) représentent une avancée significative pour interpréter des tests génotypiques destinés à prédire la résistance au pyrazinamide. Toutefois, les mutations identifiées dans PncA présentent une très grande diversité du point de vue de la nature des substitutions et de leur positionnement sur la protéine, ce qui rend difficile l'interprétation de l'effet de ces mutations à partir de la modélisation tridimensionnelle l'enzyme. Il faut donc compléter l'analyse structurale par des études biochimiques visant à déterminer l'effet des mutations sur l'activité enzymatique de la pyrazinamidase, ainsi que sur la stabilité globale de la protéine PncA, un facteur qu'il faut également prendre en compte dans l'analyse des mutants.
Pour poursuivre ces travaux, nous allons entreprendre une caractérisation biochimique et structurale systématique des mutations décrites dans PncA. Cette étude sera basée sur l'approche *in vitro* que nous avons développée en 2009 et qui nous permet de reproduire artificiellement les mutants PncA observés à partir des souches cliniques. Dans une 1èer phase, l'étude portera sur la caractérisation de mutants identifiés au CNR-MyRMA à partir de souches considérées sensibles au PZA selon les tests phénotypiques. Ces mutants seront caractérisés par rapport à l'enzyme sauvage et à des mutants issus de souches connues pour être résistantes, (i) pour les constantes cinétiques (kcat et Km) de l'activité pyrazinamidase, (ii) pour la stabilité de repliement de la protéine PncA (technique dite du « Thermal Shift Assay ») et (iii) pour la structure 3D de PncA (modélisation moléculaire).

Ce travail nous aidera à développer une technique biochimique destinée à évaluer la résistance de *M.tuberculosis* au pyrazinamide par expression in vitro des pyrazinamidases mutées et mesure de leur activité enzymatique par spectrométrie de masse.

Etude structurale et biochimique de cibles d'intérêt pour le développement de nouveaux antituberculeux (ADN gyrase et ATP synthase)

ADN gyrase et fluoroquinolone
Grâce à une collaboration avec une équipe de cristallographe, l'obtention de la structure du domaine de coupure/ligation de l'ADN gyrase, qui comprend les QRDR de GyrA et GyrB, nous a permis de modéliser les mutations impliquées dans la résistance aux fluoroquinolones dans la structure 3D (Pitton J, PlosOne 2010 ; 5(8) : e12245).
Nous poursuivrons l'étude de l'interaction entre les ADN gyrases mutées et les fluoroquinolones en analysant les modèles 3D afin de définir l'impact leurs impact en particulier celui des mutations dans GyrB, pour lesquelles nous disposons à ce jour de peu d'information.
Par ailleurs, en nous appuyant sur notre capacité de produire et analyser des ADN gyrases mycobactériennes, nous poursuivrons notre programme de conception et d'évaluation de nouveaux dérivés de fluoroquinolones, notamment dans le cadre de collaborations déjà établies par le passé avec des équipes de chimistes françaises et indiennes.

Enfin, en raison de la confusion entrainée par un double système de numérotation des mutations de la sous-unité B utilisé chez *M.tuberculosis et E.coli*, nous proposerons un système de numérotation universelle qui permettra aux équipes de comparer leurs résultats.

Analyse structurale de l'ATP synthase membranaire de M.tuberculosis et Mécanisme d'action du nouvel antituberculeux TMC207
Une des cibles antituberculeuses les plus prometteuses à l'heure actuelle est l'ATP synthase, enzyme clé du métabolisme des mycobactéries. L'ATP synthase est une protéine qui comporte un domaine transmembranaire permettant la translocation des protons, appelé Fo, couplé à un domaine cytosoluble F1 lié à Fo et qui contient le site catalytique. Les diarylquinolines, une nouvelle classe de molécules caractérisées par une forte activité antimycobactérienne, agissent en bloquant la synthèse d'ATP par liaison au domaine Fo de l'ATP synthase. Un des composés, le TMC207, inhibe très efficacement et très spécifiquement *M.tuberculosis*, y compris les souches résistantes aux antituberculeux classiques.

Les bases moléculaires de l'interaction du TMC207 avec l'ATP synthase mycobactérienne ne sont toujours pas comprises et la structure 3D de l'enzyme mycobactérienne étaestnt inconnue.
Nous avons récemment sélectionné in vitro des souches de *M.tuberculosis* mutantes résistantes au TMC207 qui portent des mutations dans le domaine Fo de l'ATP synthase. Ces résultats suggèrent que la résistance au TMC207 se développera probablement lorsque le TMC207 sera utilisé en thérapeutique, ce qui nous pousse à décrypter le mécanisme moléculaire d'inhibition de l'ATP synthase mycobactérienne par les diarylquinolines.
Notre objectif est d'exprimer, purifier et déterminer la structure tridimensionnelle de l'ATP synthase des mycobactéries, en particulier celle du domaine Fo qui est le candidat le plus plausible pour être la cible d'interaction du TMC207. Ceci implique de déterminer une structure 3D expérimentale de l'enzyme, objectif qui sera abordé dans un 1er temps par la détermination par microscopie électronique de l'enveloppe du macro-complexe transmembranaire (la cryo-microscopie électronique et l'analyse à haute résolution d'images de cristaux et de particules isolées seront réalisés en collaboration avec l'IMPMC de l'Université Pierre et Marie Curie). Dans une 2ème phase, le projet visera à déterminer la structure tridimensionnelle détaillée de l'ATP synthase mycobactérienne et à réaliser une étude de ses interactions avec le TMC207 par SPR (surface Plasmon Resonance) à partir d'ATP synthase sauvage et de mutants résistants au TMC207.

Etude du développement de la résistance aux antituberculeux

L'étude des mécanismes de résistance aux antituberculeux à partir de souches cliniques est une approche complexe qui nécessite de prendre en compte non seulement l'acquisition de mutations chromosomiques modifiant des mécanismes enzymatiques, mais aussi le contexte dans lequel s'expriment ces mutations : rôle du fond génomique dans l'expression des effets d'une mutation, effet sur le fitness, interaction avec d'autres mécanismes importants pour la cellule (métabolisme énergétique, transport au niveau de la paroi, expression de facteurs liés à la « virulence »). Un des objectifs du laboratoire est d'intégrer à moyen terme le rôle joué par ces différents facteurs dans l'expression des mécanismes de résistance.

Pour aborder cette question, nous avons initié un programme de recherche visant à reproduire les mutations identifiées à partir de souches cliniques dans un sytème isogénique, d'une part in vitro (sélection de mutants sur milieu contenant l'antibiotique sélecteur), d'autre part in vivo en utilisant un modèle d'infection à *M.tuberculosis* chez la souris. Nous pourrons ainsi déterminer, en fonction du fond génétique utilisé, (i) si des mutations spécifiques sont préférentiellement sélectionnées in vitro et in vivo, ou encore à partir de certaines lignées de *M.tuberculosis*, (ii) si les niveaux de résistance sont équivalents ou dépendent du contexte d'expression de la mutation, et (iii) si les mutations ont un effet de « fitness » à prendre en compte dans la virulence et/ou la capacité de transmission du mutant considéré.

C.3.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *M. abscessus*

Etude de la sensibilité à la clarithromycine chez *Mycobacterium abscessus* au cours des infections broncho-pulmonaires; développement de tests diagnostiques prédictifs d'efficacité thérapeutique

L'efficacité des antibiotiques dans le traitement des infections à *Mycobacterium abscessus* complex est très incertaine du fait de leur multirésistance naturelle et de l'absence de corrélation entre les tests de sensibilité faits in vitro et l'efficacité thérapeutique. Même l'activité de la clarithromycine, qui était jusqu'à présente l'antibiotique de référence, est remise en cause. Nous avons précédemment montré que *M. abscessus* comportait plusieurs sous espèces ou groupes différant par leur sensibilité à la clarithromycine. Notre objectif est maintenant de montrer que la sensibilité à la clarithromycine peut être prédite par des tests moléculaires que nous allons standardiser afin d'être prédictif d'efficacité thérapeutique chez les malades atteints de mucoviscidose et présentant une infection broncho-pulmonaire à *M. abscessus*.
L'étude s'appuie sur les résultats obtenus précédemment dans le cadre du contrat 2008-2009 à partir d'une collection de 87 souches de *M. abscessus* complex identifiées par des méthodes moléculaires et pour lesquelles les gènes de résistance à la clarithromycine (*erm41* et *rrl*) avaient été étudiés.

La première étape est de démontrer que le gène *erm41* de sequevar C18 que nous avions observé chez un sous groupe de *M. abscessus-abscessus* et le gène *erm41delta276* observé chez les souches de *M. abscessus-massiliense* sont responsables d'une sensibilité à la clarithromycine alors que les sequevar T28 observés chez un deuxième sous groupe de *M. abscessus-abscessus* et chez *M. abscessus-bolletii* confèrent une résistance. Pour cela ces gènes vont être clonés dans un vecteur s'exprimant chez *M. abscessus* (pJV53-Km^R) et introduits en *trans* chez des souches de référence pour lesquelles le gène *erm41* d'origine aura été inactivé.
La deuxième étape sera de sélectionner des mutants résistants à la clarithromycine à partir des souches de référence des quatre principaux variants ou sous groupes de *M. abscessus* cités ci-dessus, et de vérifier la concordance entre l'acquisition de résistance et la présence de mutations dans le gène *rrl* codant l'ARN 23S.
La troisième étape sera de préparer le prototype du test moléculaire diagnostique. Ce test sera basé sur le principe du DNA strip test associant une PCR multiplex amplifiant les gènes *erm41* et *rrl*, et des sondes oligonucléotidiques spécifiques des allèles détectés.

Nous pensons démontrer par les expériences génétiques de « knock-out » et de complémentation que le sequevar T28 de *erm41* confère une résistance à la clarithromycine (CMI>16 mg/L) et que par contre les sequevars C18 et *erm41delta276* confèrent une sensibilité à la clarithromycine telle que celle mesurée lors de nos travaux précédents (CMI<1 mg/L). Par l'étude de sélection des mutants résistants, nous allons pouvoir répertorier les mutations *rrl* les plus fréquentes afin de les représenter comme sondes spécifiques dans le test de détection de la résistance. La mise au point du test d'hybridation sur bandelette sera facilitée par la collaboration avec les ingénieurs scientifiques des industriels partenaires, collaboration déjà validée dans le passé pour d'autres tests maintenant commercialisés pour d'autres bactéries. Enfin, nous attendons une bonne concordance entre les résultats de ce test et les données de PCR-séquence et les tests phénotypiques de sensibilité à la clarithromycine obtenus précédemment pour les 87 souches de notre collection.

Une fois le test moléculaire mis au point, nous pourrons envisager d'appliquer systématiquement ce test à toutes les souches reçues dans le cadre de notre expertise du Centre National de Référence des mycobactéries et résistance des mycobactéries aux antituberculeux, afin de conseiller (gènes conférant la sensibilité) ou déconseiller (gènes conférant la résistance) un traitement par clarithromycine en cas d'infection. Une étude multicentrique nationale diagnostique et thérapeutique des infections à *M. abscessus* pourra alors aussi être envisagée en collaboration avec des centres prenant en charge des patients atteints de mucoviscidose et présentant un isolement positif à *M. abscessus* à partir d'un prélèvement respiratoire.

C.3.3. Mécanismes de résistance aux antilépreux

Après l'étude moléculaire et la mise au point du test diagnostique GenoType®LepraeDR pour la détection de la résistance à la dapsone, la rifampicine et les fluoroquinolones, nous prévoyons de poursuivre nos travaux sur la résistance aux anti-lépreux dans 3 projets :

- suivi des mutations observées chez les souches cliniques en particulier dans le cadre du réseau de l'OMS et évaluation de l'implication des nouvelles mutations dans la résistance
- étude de l'activité de nouvelles fluoroquinolones sur des souches sensibles et évaluation de la résistance croisée en testant l'activité sur des souches résistantes (projet avec co-financement Ordre de Malte)
- mise au point de nouveaux tests pour la détection de la résistance aux antilépreux de seconde ligne : clarithromycine, minocycline, TM207

C.4. Capacités techniques actuelles dans le domaine du CNR

C.4.1. Liste des techniques disponibles

Techniques phénotypiques

Techniques de diagnostic
- Microscopie
- Cultures en milieux solides et liquides
- Amplification génique

Techniques d'identification
- Techniques phénotypiques classiques (caractères culturaux, morphologiques et biochimiques)
- Immunochromatographie (AgMPT64®, Eurobio Biocentric)
- Spectrométrie de masse en MALDI-TOF

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

Techniques pour l'évaluation de l'activité de nouveaux antibiotiques
- Méthodes in vitro : CMI, étude de la bactériostase (MGIT avec module d'analyse TB eXiST BD), bactéricidie, inhibition des fonctions enzymatiques de l'ADN gyrase (IC_{50}) pour les fluoroquinolones
- Méthodes in vivo : modèles de chimiothérapie expérimentale chez la souris pour *M.tuberculosis, M.leprae, M.ulcerans, M.avium, M.chelonae*.

Techniques génotypiques
Les techniques génotypiques utilisées sont listées dans le **Tableau 1**, séparément pour l'identification, les tests de sensibilité aux antimycobactériens (mutations impliquées dans la résistance acquise) et le génoypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques).

Tableau 1 : Techniques génotypiques utilisées au CNR-MyRMA

A. identification bactérienne

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène
Complexe *tuberculosis*	Accuprobe® Xpert® MTB/RIF GenoType®MTBDR*plus* GenoType®MTBDRsl Real Accurate Mycobacterium tuberculosis (Patho Finder)®	
Espèces au sein du complexe *tuberculosis*	Genotype MTBC® MIRU-VNTR 12-24 loci	
Mycobactéries atypiques "courantes"	Accuprobe Genotype® CM	
Mycobactéries atypiques "rares"	Genotype® AS	
Toutes les mycobactéries		*rpoB, gyrA, gyrB* ARN 16S et 23S *hsp65*
Complexe *abscessus*		*erm41*
M. ulcerans		IS2404
M. leprae	GenoType®LepraeDR	RLEP

B. Détection de mutations déterminant la résistance acquise aux antimycobactériens

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène	Antibiotiques
Complexe *tuberculosis*	CepheidXpert RIF		rifampicine
	MTBDR*plus*®[a]		rifampicine,isoniazide, éthionamide
	MTBDRsl®[b]		amikacine,kanamycine, capréomycine,éthambutol, fluoroquinolones
		katG	isoniazide
		inhA	Isoniazide, éthionamide
		pncA	pyrazinamide
		etha	éthionamide
		ethr	éthionamide
		rrs	amikacine,kanamycine, capréomycine
		rpsl	streptomycine
		embB	éthambutol
Toutes **mycobactéries**		*rpoB*	rifampicine
		gyrA	fluoroquinolones
		gyrB	fluoroquinolones
M.abscessus		*erm*	macrolides
Mycob. aypiques		ARN23S	macrolides
M. leprae	GenoType®LepraeDR		rifampicine,fluoroquinolones, dapsone

C. Génotypage

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène
Complexe *tuberculosis*	MIRU-VNTR 12-24 loci	RFLP IS6110
Mycobac atypiques		Electroph. champ pulse, REP-PCR Diversilabs

C.4.2. Collections de souches de référence

Description des souches

Depuis la mandature 2001-2005, nous mettons à disposition des laboratoires, des souches de *M.tuberculosis* résistantes aux antituberculeux de première ligne. Dans un 1er temps, pour répondre aux besoins dans ce domaine et dans l'objectif d'aider à rationaliser les tests de sensibilité aux antituberculeux, mais aussi avec le souci d'éviter les échanges de souches multirésistantes qui sont hautement dangereuses, nous avons préparé des souches monorésistantes (à l'isoniazide, haut et bas niveau de résistance, à la rifampicine, à la streptomycine et à l'éthambutol). Pour cela, des mutants résistants ont été sélectionnés in vitro lorsque des souches d'origine clinique n'étaient pas disponibles.
Pour chaque souche de cette collection, le phénotype de résistance a été confirmé par la méthode des proportions (méthode de référence pour les antibiogrammes de *M.tuberculosis*), quantifié par la détermination de la concentration minima inhibitrice et le mécanisme de résistance a été caractérisé génétiquement.

Tableau 2. **Souches monorésistantes aux antituberculeux de première ligne disponibles au CNR pour contrôle de qualité avec leurs noms et caractéristiques génétiques et phénotypiques**

Souche de *M.tuberculosis*	Génotype	Phénotype de résistance en milieu de Löwenstein Jensen
Isoniazide bas niveau	*inhA* -15CT	100% résistance isoniazide 0,2 mg/l, sensible
Isoniazide haut niveau	*KatG* S315T	100% résistance isoniazide 1 mg/l, sensible 10 mg/l
Rifampicine	*RpoB* S531L	100% résistance rifampicine 40 mg/l
Streptomycine	*Rpsl* L43A	100% résistance streptomycine 4 mg/l

Dans le cadre du réseau de l'OMS sur la surveillance de la résistance aux antilépreux, nous avons reçu en 2010 une collection de souches de *M.leprae* avec des résistances, identifiées phénotypiquement et génétiquement, à la dapsone, la rifampicine et à l'ofloxacine. Notre projet est d'entretenir ces souches vivantes par inoculation annuelle à la souris nude.

Par ailleurs le laboratoire conserve des souches de référence achetées à la Collection de l'Institut Pasteur ou à l'American Type Culture Collection qu'il utilise pour des études de recherche appliquée ou fondamentale.

Enfin le laboratoire conserve l'ensemble des souches adressées pour expertise pour une durée de 10 ans.

Condition de stockage

Le stockage de l'ensemble de ces souches est faite par le biais d'un souchier dont le fichier est stocké sur un ordinateur situé sur le réseau de l'hôpital Pitié-Salpêtrière et bénéficiant de ce fait d'une sauvegarde.
Les souches sont conservées dans du 7H9 glycérolé dans un congélateur à -80°C.
Les lépromes reçus au CNR-MyRMA pour recherche de *M.leprae* sont conservés à -80°C.
Parallèlement à la conservation des souches, le CNR s'est équipé en 2010 d'un congélateur -40°C spécifiquement dédié à la conservation des ADN extraits des souches pour lesquelles une analyse de biologie moléculaire est demandée.

Conditions de mise à disposition des collections

Les souches sont à la disposition de tous les laboratoires et sont envoyées sur demande. Elles ont déjà été mises à la disposition des laboratoires de microbiologie du groupe Azay-mycobactéries (constitué par une trentaine de laboratoires des hôpitaux universitaires participant à la surveillance de la résistance primaire et secondaire) pour ceux qui voulaient organiser des contrôles de qualité internes.
Les souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux ne sont disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français possédant un local de sécurité biologique de niveau 3 (P3) et réalisant des tests de sensibilité. Les souches résistantes aux antituberculeux de deuxième ligne ne seront disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français réalisant des tests de sensibilité de deuxième ligne.

D. Bilan des activités scientifiques et techniques : rapport d'activité du CNR-MyRMA 2010, bilan 2006-2010

D.1. Activités au titre de l'expertise microbiologique

D.1.1. Evaluation de nouvelles techniques

Trousse Genotype® MTBDR*sl* (Hain) pour la co-détection rapide de mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux de seconde ligne

En 2010, le CNR-myRMA a publié les résultats de l'évaluation de la trousse Genotype® MTBDRsl destinée à la détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques de seconde ligne chez M.tuberculosis. Cette trousse vise à identifier rapidement la résistance à l'éthambutol, aux aminosides et aux fluoroquinolones, à partir d'une culture positive ou d'un prélèvement pulmonaire positif à l'examen microscopique,. La trousse est basée sur l'amplification de plusieurs gènes impliqués dans la résistance suivie d'une hybridation des amplicons sur des sondes spécifiques d'une mutation ou d'une séquence de l'allèle sensible, ces sondes étant pré-fixées sur une bandelette. Les résultats sont lus comme un code-barre, chacune des barres correspondant à une sonde.
Les résultats obtenus par la trousse MTBDRsl ont été comparés à ceux du séquençage ADN des régions déterminant la résistance dans les gènes gyrA et gyrB (fluoroquinolones), rpsl (streptomycine), rrs et tlyA (aminosides-capréomycine) et embB (éthambutol). La sensibilité et la spécificité du test MTBDRsl pour détecter la résistance étaient : fluoroquinolones 87% / 96%, amikacine 100% / 100%, kanamycine 77% / 100%, capréomycine 80% / 98% et éthambutol 57% / 92%. L'analyse des résultats discordants montre que 3 souches résistantes aux fluoroquinolones (dont une XDR) avaient des mutations dans gyrB qui ne sont pas détectables par MTBDRsl. A l'inverse, le test MTBDRsl a identifié comme résistant une souche sensible aux fluoroquinolones qui avait une double mutation de gyrA (T80A-A90G), cette mutation étant connue pour ne pas conférer une résistance aux FQ. Cinq souches (dont 2 XDR) sans mutation dans rrs étaient pourtant mono-résistantes aux aminoglycosides ou à la capréomycine et n'ont pas été détectées par le test MTBDRsl. Enfin, 12/28 souches résistantes à l'éthambutol ne présentaient aucune mutation au niveau du codon 306 dans embB, alors que 2/24 souches sensibles à l'éthambutol avaient une telle mutation.
Au total, le test MTBDRsl détecte efficacement les mutations les plus fréquemment impliquées dans ces résistances, en particulier pour l'amikacine. Toutefois, les performances du test sont limitées par l'absence de certaines mutations impliquées dans la résistance et par la limite de nos connaissances certains mécanismes de résistance, en particulier à l'éthambutol.. Le test est très intéressant pour une première analyse rapide des souches MDR pour lesquelles la détection classique de la résistance aux antituberculeux de seconde ligne est délicate et longue.

Ce travail a été publié : Brossier F, et al. J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1683-9

Mise au point et première évaluation de la technique « SNaPshot minisequencing-based assay »

En 2010, le CNR a publié les travaux sur le développement et l'évaluation d'une nouvelle technique simple et rapide basée sur un mini-séquençage des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et une analyse par électrophorèse capillaire permettant simultanément l'identification et la différentiation des mycobactéries appartenant au complexe M.tuberculosis, ainsi que la classification des souches de M.tuberculosis selon 7 groupes phylogénétiques (technique SNaPshot, Figure 1).

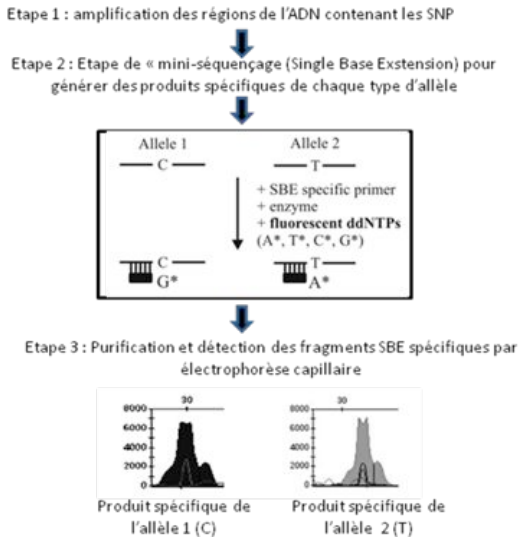


Figure 1 : Principe de l'analyse des SNP par SNaPshot et détection des allèles par électrophorèse capillaire

La méthode repose sur l'analyse de deux groupes de 8 fragments du génome portant des sites de polymorphisme ponctuel encore appelés SNP : 8 SNPs localisés au niveau des gènes hsp65, gyrB et rrs pour la différentiation des espèces au sein du complexe M. tuberculosis, et 8 autres SNP permettant le génotypage des souches de M.tuberculosis selon 7 groupes phylogénétiques appelés SCG (SNP Cluster Group). Cette étude a démontré que l'analyse SNaPshot représente une alternative intéressante pour l'identification et le typage des souches du complexe M.tuberculosis, dans un format qui peut être facilement automatisable. Ceci pourrait permettre un pré-typage simple et rapide des espèces du complexe M.tuberculosis.

Ce travail a été publié : Bouakaze C, et al. J Clin Microbiol May;48(5):1758-66

Evolution de la technique SNaPshot minisequencing-based assay : mise au point d'un test basé sur une PCR unique « 16-plex » et une analyse des amplicons par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

En 2010, le CNR a participé à une étude visant à faire évoluer la technique SNaPshot vers un nouveau format permettant l'amplification SBE simultanée des deux groupes de PCR 8-plex dans un tube unique (PCR 16-plex) et la différentiation des fragments spécifiques de chaque type d'allèle par spectrométrie de masse.
Cette stratégie repose sur l'utilisation d'une nouvelle technologie de génotypage SNP appelée « iPLEX Gold » (Sequenom). Cette technologie est basée sur une réaction de mini-séquençage SBE similaire à celle du SNaPshot fluorescent, mais dans laquelle les terminateurs fluorescents, utilisés dans l'approche SNaPshot classique, sont remplacés par des amorces de discrimination allélique spécifiquement marquées par des nucléotides terminateurs caractérisés par des masses spécifiques de chaque allèle. Les produits obtenus après mini-séquençage SBE sont analysés par spectrométrie de masse à temps de vol (MALDI-TOF MS) permettant de mettre en évidence les différences de masse correspondant à chaque allèle, comme l'illustre la **figure 2**.

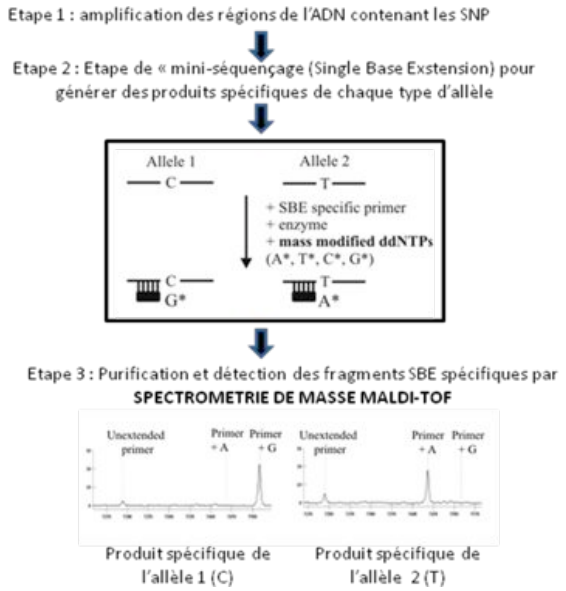


Figure 2 : Principe de l'analyse SNaPshot et détection des allèles par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Ainsi, la technologie iPLEX Gold allie les avantages d'un mini-séquençage SBE (robustesse) à la sensibilité, la rapidité et la précision d'une détection en MALDI-TOF (**Figure 3**).

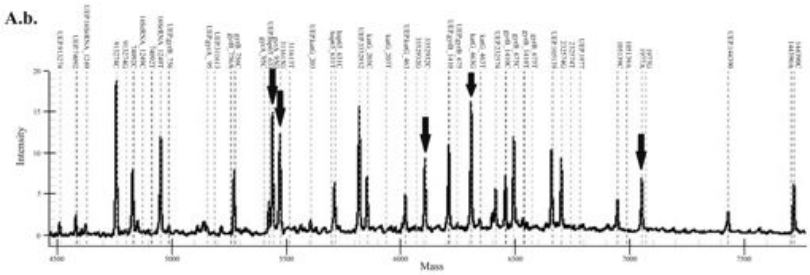


Figure 3 : Exemple de spectre de masse MALDI-TOF obtenu par la technique iPLEX Gold 16-plex MassARRAY » (Sequenom) à partir d'une souche H37rv de *M.tuberculosis*.

La nouvelle technique «iPLEX Gold 16-plex MassARRAY» a été évaluée en comparant les résultats à ceux du test Snapshot publiés en 2010, sur la même collection de 55 souches appartenant au complexe *M.tuberculosis*. La réaction de mini-séquençage SBE a été réalisée à l'aide de la trousse « iPLEX Gold SNP genotyping" (Sequenom) et les produits obtenus par SBE ont été analysés sur une plateforme MassARRAY® (Sequenom). La totalité des SNP, qui avaient été caractérisés à partir de deux PCR 8-plex dans la précédente étude SNaPshot, a été détectée sans ambiguïté par la nouvelle approche «iPLEX Gold 16-plex MassARRAY », excepté pour *M.canettii* qui donnait des résultats négatifs pour certains SNP.
L'ensemble des SNP analysés par « iPLEX Gold SNP genotyping" ont été identifiés sans ambiguïté pour les 55 souches de MTBC incluses dans l'étude, ainsi que les groupes phylogénétiques SCG auxquels ces souches se rattachent (**Tableau 3**).

MTBC sample (n=55)	PGG	SCG	hsp65[-81]	katG[-40]	gyrA[-95]	katG[-203]	16S rRNA[+20]	gyrB(675)	gyrB(756)	gyrB(1410)	1977	3352929	74692	1051359	2460626	1443590	232574	311613	913274
clinical *M. canettii* (n=1)	1b	1	T	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	-	C	G	G	T	G
clinical *M. tuberculosis* (n=2) and *M. africanum* (n=1)	1b	1	C	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	G
clinical *M. tuberculosis* (n=3)	1b	2	C	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	A	C	G	G	T	C
clinical *M. tuberculosis* (n=2)	1b	3a	C	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	C
clinical *M. tuberculosis* (n=9)	2	3b	C	C	C	G	T	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	C
clinical *M. tuberculosis* (n=13)	2	5	C	C	C	G	T	C	G	C	G	C	C	C	C	G	G	T	C
clinical *M. tuberculosis* (n=5)	3	6a	C	C	G	G	T	C	G	C	A	C	C	C	C	C	G	T	C
M. tuberculosis H37Rv (n=1)	3	6b	C	C	G	G	T	C	G	C	A	C	C	C	C	G	G	G	C
clinical and reference *M. bovis* (n=7) and *M. bovis* BCG (n=5)	1a	7	C	A	C	A	T	C	A	T	G	G	T	C	C	G	G	T	G
clinical *M. caprae* (n=1)	1a	7	C	A	C	A	T	C	A	C	G	G	T	C	C	G	G	T	G
clinical *M. microti* (n=1)	1a	1	C	A	C	A	T	T	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	G
clinical *M. pinnipedii* (n=1)	1a	1	C	A	C	A	C	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	G
clinical *M. africanum* (n=3)	1a	1	C	A	C	A	T	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	G

Tableau 3 : SNP analysées par « Iplex Gold SNP genotyping » dans 55 souches de *M.tuberculosis* et groupes phylogénétiques SCG auxquels ces souches se rattachent

En conclusion, la nouvelle méthode «iPLEX Gold 16-plex MassARRAY» montre une excellente reproductibilité et produit des résultats parfaitement concordants lorsqu'elle est comparée à la méthode SNaPshot classique. Grâce à l'utilisation de l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF, elle permet d'obtenir dans un délai très court et pour un coût raisonnable (moins de 4 €) des données d'identification et de typage qui peuvent être aisément interprétées et exploitées par des algorithmes dédiés.
Les résultats de ce travail sont en cours de soumission pour publication à la revue Journal of Clinical Microbiology.

Identification des mycobactéries par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS)

L'identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) a pris un essor très important en bactériologie médicale. Elle est encore peu utilisée en mycobactériologie où l'identification repose principalement sur des techniques moléculaires, biochimiques ou antigéniques (pour M. tuberculosis).
Nous avons participé à une évaluation de la spectrométrie de masse en MALDI-TOF pour l'identification des mycobactéries en collaboration avec l'équipe de microbiologie de l'hôpital Necker.
Nous avons fourni des souches de mycobactéries identifiées précisément par technique moléculaire (séquençage des gènes hsp et rpoB).
Un total de 311 souches appartenant à 31 espèces distinctes et 4 complexes cultivées en milieu de Löwenstein-Jensen (LJ) et liquide (MGIT) ont été analysés. Aucune étape d'extraction n'a été nécessaire. Une identification correcte a été obtenue pour 97% des souches cultivées sur LJ et 77% de celles cultivées sur MGIT. Aucune erreur d'identification n'a été notée.
Ces résultats, basés sur un protocole très simple, suggèrent que ce système peut représenter une alternative pour les laboratoires cliniques pour identifier les espèces mycobactériennes.

Ce travail a été publié : Lotz A. et al. J Clin Microbiol 2010; 4481-4486.

Résumé des évaluations de nouvelles techniques menées en 2006-2010

Outre les évaluations menées en 2010 exposées ci-dessus, le CNR-MyRMA a mené les évaluations suivantes :

Evaluation des trousses Genotype® MTBDR (Hain) (1ère version et version « plus ») pour la co-détection rapide de mutations impliquées dans la résistance de M. tuberculosis à la rifampicine et à l'isoniazide

La trousse Genotype® MTBDR (Hain) et sa version améliorée, Genotype MTBDR *plus* ® sont destinés à la détection rapide de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide de *M. tuberculosis*, basée sur l' hybridation sur bandelette d'amplicons PCR des zones d'intérêt des gènes *rpo*B (ARN polymérase), *katG* (catalase-peroxydase) et du promoteur du gène *inh*A (enoyl-ACP reductase). Le test permet de mettre en évidence des mutations impliquées dans la résistance à la rifampicine (codons 505 à 533 de *rpoB*) et à l'isoniazide : (a) codon 315 de *katG* impliqué dans la résistance à haut niveau à l'isoniazide, et, dans la version « plus », les positions -8, -15 et -16 du promoteur de inhA impliquées dans la résistance à bas niveau à l'isoniazide).
Nous avons évalué les performances de ces trousses en comparaison à ceux du séquençage complet des gènes *kat*G, *inh*A et du promoteur du gène *inh*A pris comme «gold standard». Nous avons ainsi montré que ces trousses permettent de détecter : (a) toutes les souches résistantes à la rifampicine») et (b) significativement plus de souches résistantes à l'isoniazide avec la 2ème qu'avec la 1ère version du test (88 vs. 70%), en particulier plus de souches résistantes à bas niveau (69% vs. 17%). La spécificité est très bonne puisque pour toutes les souches sensibles à l'isoniazide et toutes les souches sensibles le résultat est « absence de mutation, le résultat du test est « absence de mutation ».

En prenant comme base la distribution des mécanismes de résistance à l'isoniazide observe en France, on pourrait déduire (a) que la valeur prédictive négative du test « plus » est très bonne (>95%) tant que la prévalence de la résistance à l'isoniazide est inférieure à 20% mais chute au-delà et (b) que le nombre de cas de résistance à l'isoniazide non détectés par ce test parmi 100 malades testés est acceptable (<1) lorsque la prévalence de la résistance est inférieure à 5% mais est inacceptable lorsqu'elle est à 30% (n=4) et à plus forte raison de 70% (n=10).

Ces travaux ont été publiés :
Brossier F, *et al.* Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2009 ; 13 : 260-5 et
Brossier F, *et al.* J. Clin. Microbiol. 2010 ; 48 : 1683-9

Evaluation de nouvelles techniques d'amplification génique (TAG) de M.tuberculosis complex pour le diagnostic de la tuberculose (BioRad Real Time TB Assay ®)

Une des approches possibles pour améliorer les performances des TAG est de faire appel aux techniques d'amplification dites « en temps réel » qui sont plus sensibles et plus robustes que les techniques PCR classiques.
En 2006, nous avions entrepris l'évaluation d'un nouveau test d'amplification « temps réel » Biorad Real time TB Assay® permettant, par amplification de la séquence d'insertion IS6110 et de la région RD9 du gène de *M.tuberculosis*, d'identifier dans un prélèvement la présence de bacilles de la tuberculose et de différencier *M.tuberculosis* des autres espèces du complexe *tuberculosis*. Les conclusions de cette première étude indiquaient une sensibilité « brute » du test de 90% pour l'ensemble des échantillons (100% pour les échantillons M+ et 77% pour les échantillons M0) et une spécificité « brute » de 93%, résultats globalement très encourageants.

En 2007, la société Biorad a développé une nouvelle version du kit Real time TB appelée NAT RT TB® incluant de nouvelles sondes de détection destinées à augmenter la stabilité du test au cours du temps. Nous avons évalué cette version à partir de 96 échantillons cliniques collectés en routine. Par rapport à la culture, le test NAT RT TB a permis l'identification de 16 des 17 prélèvements contenant *M. tuberculosis*. La sensibilité brute du test était donc de 94%. Point remarquable, la sensibilité parmi les échantillons négatifs à l'examen microscopique mais positifs à la culture était de 86%. Globalement, ces résultats suggérent que le test NAT RT TB® est prometteur pour la détection des mycobactéries du complexe *tuberculosis* directement à partir de prélèvements d'origine respiratoire, avec une possibilité de différentiation entre *M.tuberculosis* et les autres espèces du complexe *tuberculosis*.
La sensibilité de 86% dans les échantillons M0 observée avec la nouvelle version du test NAT RT TB®, n'ayant jamais été atteinte avec aucun autre kit d'amplification, nous avons entrepris une évaluation du kit sur une cohorte de 222 malades hautement suspects de tuberculose. Pour cibler cette population, les cliniciens de l'hôpital expérimentés dans la prise en charge de la tuberculose (pneumologues, infectiologues) avaient été avertis de l'étude et devaient signaler les prélèvements des patients cliniquement très suspects de tuberculose, patients qui avaient été mis en isolement respiratoire.

Globalement, le test a été positif (cible IS*6110* et/ou RD9) pour 25 des 39 échantillons qui avaient une culture positive à *M.tuberculosis* complex, soit 64%. Plus précisément, le test a été positif pour 100% des 6 échantillons à examen microscopique positif (M+) et positif pour 20/34 échantillons à examen microscopique négatif (M0) mais à culture positive. Le test a été négatif pour 171/182 échantillons à culture négative.
Comparée à la culture (gold standard), la sensibilité « brute » du test lors de cette évaluation a donc été de 59% pour les échantillons M-, et la spécificité « brute » de 94%, avec une VPP de 64% et une VPN de 92%, compte tenu de la prévalence élevée (12%) de la tuberculose dans cette cohorte.
En conclusion, malgré les progrès techniques (PCR temps réel, 2 séquences d'ADN cible…) le test NAT RT TB® ne peut pas être recommandé lorsque l'examen microscopique des prélèvements est négatif, car la sensibilité (63% pour l'ensemble de nos deux évaluations) est trop faible et la VPP trop faible malgré la spécificité convenable (94%) en raison de la prévalence habituellement faible de la tuberculose (≤5%) chez les patients microscope négatif pour lesquels les cliniciens demandent la recherche de *M. tuberculosis* dans les pays industrialisés.

Conception, mise au point et évaluation de la trousse GenoType® LepraeDR (Hain Lifescience) pour la détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques antilépreux à partir des lépromes

En 2007-2009, nous avons conçu, mis au point et évalué une trousse de détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques antilépreux (sulfamides, rifampicine, fluoroquinolones) en collaboration avec les Laboratoires Hain Lifescience (Nehren, Germany) et l'Ordre de Malte (programme MAGRALEPRE). Les principes de cette trousse sont basés sur l'amplification de 3 gènes de résistance suivi d'une hybridation des amplicons sur des sondes spécifiques d'une mutation ou de l'allèle sauvage, pré-fixées sur une bandelette de nitro-cellulose.
Les étapes ont été :
- le recensement de toutes les mutations associées à la résistance à la rifampicine, aux quinolones et aux sulfamides (dapsone) chez *M.leprae,*
- la vérification par des tests enzymatiques que les mutations de GyrA décrites entraînaient bien la résistance aux quinolones (cf chapitre 5 : mécanismes de résistance),
- la préparation d'une collection d'extraits d'ADN de *M.leprae* à partir de lépromes reçus au CNR-MyRMA dans le cadre des activités d'expertise (cf chapitre 3 : Sensibilité aux antibiotiques),
- la mise au point des protocoles techniques pour l'amplification génique (choix des amorces, conditions de PCR multiplex),
- la détermination des sondes d'hybridation pour les séquences cibles (a) sous leur forme sauvage : 4 sondes pour *rpoB* (résistance à la rifampicine), une pour *gyrA* (résistance aux quinolones) et une pour *folP1* (résistance aux sulfamides), et (b) sous leur forme mutées résistantes : 2 sondes pour *rpoB* (HIis26Tyr, Ser531Leu), une pour *gyrA* (Ala91Val) et une pour *folP1* (Pro55Leu, Thr53Ala),
- la mise au point de sondes pour l'identification de l'espèce *M.leprae* : séquence conservée de *rpoB..*
L' étude d'évaluation de la trousse a porté sur 99 souches provenant de lépromes en comparant les résultats au génotype obtenu par séquençage des fragments de PCR, et au phénotype obtenu par la méthode de référence de culture dans la patte de souris Swiss traitée par antibiotiques. Les résultats sont les suivants :
a) pour la rifampicine (85 souches sensibles et 14 résistantes) la concordance était de 98% avec le génotype obtenu par séquençage (97/99 résultats concordants) puisque 2 souches avaient des mutations rares dans le gène *rpoB* (codon 522, numérotation de *E. coli*) non détectées par le test. La concordance était de 100% avec le phénotype chez 84 souches (84/84) pour lesquelles nous avions eu une culture positive chez la souris. Les 2 souches avec la mutation en codon 522 étaient en fait sensibles à la rifampicine in vivo, ce qui montre que toutes les mutations dans *rpoB* n'entrainent pas nécessairement la résistance et qu'il est encore nécessaire de conserver l'expertise de l'antibiogramme chez la souris même si nous disposons maintenant d'un test diagnostique moléculaire performant.
b) pour la dapsone, la concordance était de 100% avec le génotype manuel. La concordance exacte avec le phénotype est difficile à déterminer puisque le test de sensibilité à la dapsone ne peut plus être pratiqué chez la souris depuis 2001 (impossibilité de se procurer de l'alimentation pour souris contenant de la dapsone). Néanmoins, pour les 58 des 99 souches pour lesquelles nous avions pratiqué le test chez la souris avant 2001 (48 souches sensibles, 16 résistantes dont 6 à haut niveau, 4 à niveau intermédiaire et 6 à bas niveau), la concordance était de 100% pour les sensibles (48/48), de 100% pour les souches avec un haut niveau de résistance à la dapsone (6/6), de 75% chez les souches avec un résistance de niveau intermédiaire (3/4) et de 17% seulement pour les souches avec un bas niveau de résistance (1/6).

c) pour les fluoroquinolones qui ne sont étudiées en routine sur *M.leprae* que depuis peu (4 souches sensibles et 1 résistante), la concordance était de 100% pour les 5 souches.
Afin de mesurer la spécificité analytique du test, 10 biopsies négatives, 12 biopsies contenant une mycobactérie non lépreuse (5 *M.marinum*, 2 *M.ulcerans* et 5 *M.chelonae*) et 28 cultures d'autres mycobactéries ont été testées. Aucune n'a montré de signal positif avec le test indiquant une spécificité de 100% pour la détection de *M. leprae*.
La reproductibilité a été mesurée sur 40 biopsies pour lesquelles les résultats ont été identiques dans 100% des cas.

La trousse Genotype® Leprae DR a été commercialisée en 2010 et reçu le marquage CE. La publication des résultats est en cours

Mise au point de méthodes de détection des mycobactéries dans l'eau (Projet Aquamyc)

Nous avons en 2008-2009 mis au point des méthodes de détection et de dénombrement des mycobactéries dans l'eau, en collaboration avec le Centre d'enseignement et de recherche Eau Ville Environnement (CEREVE) de l'Université Paris 12 (Françoise Lucas), le Centre de recherche d'expertise et de contrôle des eaux de Paris (CRECEP, Laurent Moulin, Sophie Haenn), la Direction de la Recherche et Développement (SIAAP, Alexandre Goncalvez) dans le cadre du Programme PIRENSEINE (Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine), et d'une Thèse en sciences de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées.
Nous disposons maintenant de méthodes microbiologiques fiables pour l'étude :
a) des eaux propres : concentration des bactéries par filtration, pas de décontamination, culture sur milieux contenant des antibiotiques,
b) des eaux sales : concentration des bactéries par centrifugation, décontamination par la soude, culture sur milieux contenant des antibiotiques et des antifongiques à forte concentration.
Ces deux méthodes ont été appliquées avec succès en 2009 :
- la première à la recherche des mycobactéries dans l'eau de réseau pour les enquêtes menées lors d'épidémie d'infection cutanée (2 épidémies, cf. chapitre 4),
- la seconde à la mesure de concentration des mycobactéries dans l'eau de la Seine recueillie à différents points correspondant à différentes stations d'épuration et différents bassins versants.
Nous avons aussi mis au point une méthode moléculaire de détection et quantification des mycobactéries dans l'eau par PCR en temps réel. L'objectif était d'avoir une méthode quantitative pouvant sursoir à la culture et permettant d'étudier de nombreux prélèvements simultanément. La méthode doit être à la fois sensible dans la détection de faible quantité de mycobactéries et spécifique pour ne pas avoir de résultat faussement positif en présence d'autres bactéries. Nous avons d'abord testé *in silico* plusieurs couples d'amorces spécifiques de différents gènes cibles et avons choisi notre cible et nos amorces. Nous avons ensuite comparé réellement notre système d'amplification aux 2 systèmes de la littérature qui nous paraissaient les plus performants, ceci sur une collection de 30 mycobactéries d'espèces différentes et sur 50 bactéries autres que les mycobactéries. La méthode que nous avons retenue est plus spécifique que les méthodes décrites jusqu'à présent même si elle est un peu moins sensible. Elle sera utilisée lors d'une campagne de prélèvements d'eau de la Marne lors en temps sec et en temps de pluie pour juger d'une éventuelle pollution par les mycobactéries dans ce cas-là.

Ces travaux ont été publiés :
Radomski N, *et al.* Appl Environ Microbiol 2010, 76:3514-20.
Radomski N, *et al*. Appl Environ Microbiol. 2010 Nov;76(21):7348-51.

D.1.2. Activités d'expertise pour les laboratoires français

Nombre de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA

Au cours de l'année 2010 le CNR-MyRMA a reçu **825 souches et 140 prélèvements (total 965)** pour identification et/ou typage moléculaire et/ou étude de la sensibilité aux antibiotiques (**Tableau 4**). Les souches et prélèvements proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et DOM-TOM (laboratoires hospitaliers, LABM...).

Tendances évolutives 2006-2010
Après une augmentation brutale de 50% entre 2005 (dernière année de la coexistence de 2 CNR des mycobactéries, l'un à l'Institut Pasteur de Paris et l'autre à la Pitié-Salpêtrière) et 2006, le nombre de souches et prélèvements reçus au CNR- MyRMA s'est stabilisé autour de 1000 par an.

D.1.2.1. Identification de souches

Parmi les **825 souches** reçues :
- 31 souches reçues en double, contaminées ou identifiées comme des espèces non mycobactériennes n'ont pas été étudiées
- **794 souches ont été soumises à identification** de l'espèce mycobactérienne et, pour la plupart ont été aussi soumises à antibiogramme phénotypique et/ou à des tests génotypiques de détection de résistance et/ou à un génotypage pour enquête épidémiologique. Ces 794 souches se répartissent en **366 souches du complexe *M. tuberculosis* (46%)** et **428 souches de mycobactéries atypiques (54%).**

Tableau 4 : Activité du CNR- MyRMA de 2006 à 2010 : nombre de souches et prélèvements reçus, détail des études mises en œuvre

	2006	2007	2008	2009	2010
Total souches et prélèvements[a]	**949**	**1062**	**1082**	**1013**	**965**
Total souches identifiées[b]	**784**	**911**	**967**	**901**	**825**
M. tuberculosis	328	370	452	369	366
Mycob. atypiques	400	455	492	504	428
dont total tests de sensibilité	**457**	**432**	**442**	**470**	**468**
M. tuberculosis[c]	207 (94)	170 (73)	185 (90)	170 (135)	160 (126)
Mycob. atypiques	250	262	227	300	308
Dont total génotypage	**220**	**215**	**183**	**192**	**153**
M. tuberculosis	280	203	172	175	153
Mycob. atypiques	-	12	11	17	-
Total prélèvements	**165**	**151**	**115**	**112**	**140**
Biopsies *M.leprae*[d]	**10 (5)**	**10 (2)**	**18 (7)**	**17 (7)**	**25 (7)**

a : en 2005, dernière année de coexistence de 2 CNR des mycobactéries (Pitié-Salpêtrière et Institut Pasteur de Paris), le nombre total de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA était de **635**
b : une petite partie des souches reçues sont déjà connues ou sont contaminées ou ne sont en fait pas des mycobactéries et n'apparaissent ni dans « *M.tuberculosis* » ni dans « Mycob. atypiques »
c : nombre de souches pour lesquelles il y a eu 2 antibiogrammes : un de 1re ligne et un de 2e ligne
d : dont N cas de lèpre bactériologiquement confirmé

Souches de M. tuberculosis complex

Parmi les 366 s*ouches de M.tuberculosis complex,* 157 ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce, soit lorsque leurs caractères phénotypiques s'écartaient de ceux typiques de l'espèce *M.tuberculosis* (ex. souches lisses, dysgoniques…), soit en tirant profit du génotypage qui, pratiqué par la méthode des MIRU, permet aussi de préciser l'espèce (cf. plus loin). Parmi ces 157 souches, **5 étaient de** l'espèce ***M. bovis var BCG*** (nombre stable depuis 2007, après un pic en 2006 probablement lié au changement de souche et de technique vaccinale), **6 souches de l'espèce *M.bovis*** (même ordre de

grandeur que les années précédentes suggérant qu'il n'y a pas d'émergence de tuberculose à bacille bovin) et **6 souches étaient** de l'espèce ***M.africanum*** (stable par rapport à 2009) (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Identification des souches de mycobactéries du complexe *M.tuberculosis* reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2010

Espèces	2006	2007	2008	2009	2010
M. tuberculosis complex	94	229	363	308	209
Identification dans le complexe tuberculosis* :	234	141	89	61	157
M. tuberculosis	189	114	63	42	140
M. bovis	7	9	11	7	6
M. africanum	11	10	11	5	6
M. bovis var BCG	27	8	4	3	5
M. caprae				2	
M. microti				2	
Total	**328**	**370**	**452**	**369**	**366**

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

Souches de mycobactéries atypiques

Parmi les 428 souches de mycobactéries atypiques reçues, la répartition était la suivante (**Tableaux 6 et 7**) :

- **178 souches (39% du total) du complexe *M.avium-intracellulare*** dont 96 *M.avium* et 82 *M.intracellulare*. La proportion des souches considérées comme responsables d'infections (n=145 soit 81%) est élevée, ce qui est en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses efforts sur les souches importantes sur le plan médical.
- **52 souches de *M.xenopi*** (12% du total). Six souches étaient d'origine extra-respiratoire : une isolée d'une biopsie rachidienne chez un patient avec un antécédent d'accident de la voie publique et uneintervention chirurgicale en Europe de l'Est, 4 isolées de prélèvements de genou dont deux correspondaient à des patients déjà connus en 2008 et deux à des nouveaux patients avec antécédents de chirurgie du genou (cf chapitre Alertes), et 1 souche a été isolée d'une prélèvement cutané et a été considérée comme une contamination. Parmi les 46 souches respiratoires, 36 (78%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **24 souches de *M.kansasii*** (6% du total), agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose.
- **7 souches de *M.simiae***. Toutes ont été considérées comme responsables d'infection respiratoire.
- **2 souches de *M.marinum***, agent classique d'infections cutanées après inoculation à partir d'aquariums ou d'animaux aquatiques. Il n'y a pas eu en 2010 de cas groupés faisant craindre une exposition commune.
- **20 souches de *M.gordonae*** qui correspondaient toutes sauf une à de contaminants. Le cas d'infection avéré correspondait à une infection urinaire chez une patiente de 74 ans greffée rénale en 2003.
- **116 souches d'espèces à croissance rapide** (27% du total) réparties dans les espèces *M.chelonae, M.abscessus*, *M.bolletii, M.massiliense, M.fortuitum, M.peregrinum, M.frederiksbergense, M.vaccae, M.mucogenicum, M.porcinum, M.phocaicum.*

Au total, 74 des 116 souches (64%) ont été considérées comme responsables d'infections, le plus souvent respiratoires dans le cadre de la mucoviscidose pour *M.abscessus* et cutanées pour *M.chelonae*.

Il faut noter que 48 des 428 souches (10% environ) de mycobactéries atypiques appartenaient à des espèces rares ou nouvellement décrites :

- 3 souches de *M.arupense* (espèce proche de *M. terrae,* décrite en 2006) : un cas de ténosynovite après contact avec des rosiers; un cas d'infection articulaire chez une agricultrice; une souche isolée d'un prélèvement respiratoire et considérée comme un contaminant.
- 1 souche de *M.chimaera* (mycobactérie proche de *M. avium,* décrite en 2004) isolée de prélèvements respiratoires chez une patiente atteinte de mucoviscidose.
. 1 souche de *M.frederiksbergense* (mycobactérie à croissance rapide décrite en 2001) isolée de l'environnement.

- 2 souches de *M.gadium* (mycobactérie à croissance rapide décrite en 1974) isolées de liquides pleuraux chez deux patients d'un même hôpital et considérées comme des contaminations de laboratoire.
- 3 souches de *M.genavense,* considérée responsable d'infection généralisée chez 3 patients : 1 infection par le VIH, 1 maladie auto-immune, 1 terrain non précisé.
- 1 souche de *M.heckeshornense* (mycobactérie proche de *M. xenopi,* décrite en 2000) isolée d'un prélèvement respiratoire et considérée comme responsable d'infection.
. 1 souche de *M.immunogenum* (mycobactérie à croissance rapide décrite en 2001) isolée d'un prélèvement de liquide utérin considérée comme responsable possible d'infection.
- 1 souche de *M. kubicae* (mycobactérie à croissance lente proche de *M. asiaticum,* décrite en 2000) isolée l'une d'un prélèvement respiratoire et considérée comme contaminant.
- 3 souches de *M.lentiflavum* (mycobactérie proche de *M.simiae* et *M.genavense,* décrite en 1996), dont une seule a été considérée responsable d'infection (respiratoire).
- 2 souches de *M.malmoense* considérées comme responsable d'infection : une infection respiratoire et une infection des tissus mous de la main.
- 9 souches de *M.massiliense* (espèce proche de *M.abscessus,* décrite en 2004) isolées de prélèvements respiratoires chez 7 malades, et considérées comme responsable d'infection dans 4 cas : 2 cas de mucoviscidose, 1 patient sous corticothérapie, 1 sans terrain prédisposant.
. 10 souches de *M.bolletii* (espèce proche de *M.abscessus,* décrite en 2006) isolées de prélèvements respiratoires de 9 patients et considérées comme responsables d'infection dans 8 cas : 5 cas de mucovicidose, 1 antécédent de mycobactériose pulmonaire, 1 déficit immunitaire congénital, 1 bronchectasie.
- 6 souches de *M.mucogenicum* (espèce proche de *M.chelonae,* décrite en 1995) isolées dans 2 prélèvements d'environnement et chez 4 patients dont l'un a été considéré infecté : un bébé présentant une bactériémie dans un contexte de déficit immunitaire congénital.
- 1 souche de *M.neoaurum* d'un prélèvement respiratoire et considérée comme contaminant.
- 2 souches de *M.porcinum* (espèce à croissance rapide proche de *M.fortuitum*) isolée de prélèvements respiratoires et considérée comme responsable d'infection chez 2 patients (1 cancer bronchique, 1 transplanté).
- 1 souche de *M.parascrofulaceum* (espèce proche de *M.simiae,* décrite en 2004) isolée de prélèvements respiratoires et considérée comme responsable d'infection.
- 1 souche de *M.vaccae* isolée d'un liquide articulaire et considérée comme responsable possible d'infection.

Au total, 308 (72%) des 428 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2010 ont été considérées comme responsables d'infections.

Tendances évolutives 2006-2010

Le **nombre de souches de mycobactéries atypiques reçues et considérées comme responsables d'infection (et donc soumises à des tests de sensibilité aux antibiotiques, cf plus loin) a augmenté de 23% entre 2006 (n=250) et 2010 (n=308)** avec une augmentation de la proportion de ces souches « pathogènes » de 62 à 72 % au sein de l'ensemble des souches de mycobactéries atypiques reçues au CNR-MyRMA. **La distribution entre les principales espèces de mycobactéries atypiques** (*M.avium-intracellulare, M.xenopi, M.kansasii,* espèces à croissance rapide) **est restée stable entre 2006 et 2010 (tableau 6)**.

Fait important dans le cadre de l'arrêt de l'obligation vaccinale en 2007, 11 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2010 ont été isolées d'adénites chez des enfants de moins de 5 ans (10 *M.avium*, 1 *M.kansasii*). Le nombre de ces cas (en général *M.avium* ou *M.scrofulaceum*) a été multiplié par un facteur 4 environ de 2006 à 2010 (**Tableau 7**). Bien que le nombre de ces cas reste faible et que le prélèvement des adénites cervicales est loin d'être systématique, **cette tendance doit conduire à la vigilance**.

Tableau 6 : Identification des souches de mycobactéries atypiques reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2010 (classement par ordre dégressif, basé sur l'année 2009)

Espèce	2006	2007	2008	2009	2010
M. avium	98 (25%)	85 (19%)	71 (14%)	105 (21%)	96 (22%)
M. intracellulare	66 (17%)	57 (13%)	77 (16%)	100 (20%)	82 (19%)
M. xenopi	47 (12%)	69 (15%)	66 (13%)	48 (10%)	52 (12%)
*M. gordonae**	20 (5%)	35 (8%)	21 (4%)	33 (7%)	20 (5%)
M. chelonae	11 (3%)	37 (8%)	41 (8%)	31 (6%)	31 (7%)
M. kansasii	27 (7%)	28 (6%)	21 (4%)	31 (6%)	24 (6%)
M. abscessus	41 (10%)	37 (8%)	44 (9%)	24 (5%)	35 (8%)
M. simiae	12 (3%)	6 (1%)	9 (2%)	19 (4%)	7 (2%)
M. fortuitum	22 (5%)	15 (3%)	18 (4%)	18 (4%)	11 (3%)
M. peregrinum	10 (3%)	20 (4%)	32 (7%)	16 (3%)	6 (1%)
M. massiliense		6 (1%)	13 (3%)	15 (3%)	9 (2%)
M. interjectum		4	1	6 (1%)	0
M. mucogenicum	4 (1%)	2	6 (1%)	6 (1%)	8 (2%)
M. scrofulaceum	1	3	5 (1%)	5 (1%)	4 (1%)
M. szulgaï	3	3	3	3	3
M. marinum	8 (2%)	6 (1%)	10 (2%)	2	2
*M. arupense**	1	4	6 (1%)	2	2
M. bolletii	1	3	5 (1%)	2	10 (2%)
M. genavense			1	2	3
M. haemophilum	1			1	0
M. malmoense	3	3	8 (2%)	1	2
M. ulcerans			1		1
Autres espèces	24 (6%)	32 (8%)	34 (7%)	34 (7%)	20 (5%)
Total	**400**	**455**	**492**	**504**	**428**
Responsables d'infections	**250**	**262**	**227**	**300**	**308**
(**N** et %)**	62%	58%	46%	59%	72%

*** espèces considérées comme non pathogènes**
**** sur la base de critères historiques, cliniques et bactériologiques (ex. recommandations de l'American Thoracic Society…).**

Tableau 7 : Evolution de 2006 à 2010 du nombre de souches de mycobactéries atypiques issue d'adénites rvicales d'enfants de moins de 5 ans

Année	N de cas
2006	3
2007	5
2008	7
2009	9
2010	11

Identification à partir de prélèvements cliniques

Parmi les 140 prélèvements reçus au CNR-MyRMA :
- 128 prélèvements ont été mis en culture : 82 cultures étaient négatives, 6 contaminée et 40 positives à : *M.tuberculosis complex* (n=27), *M.genavense* (n=3), *M.xenopi* (3), *M.ulcerans* (n=2), *M.szulgaï* (n=2), *M.simiae* (n=1), *M.avium* (n=1), *M.scrofulaceum* (n=1).

- 92 prélèvements ont fait l'objet d'un test d'amplification génique directe : soit la PCR Amplicor® spécifique de l'ADN de *M.tuberculosis* complex, soit une amplification par Taqman Real Accurate suivie de séquençage du gène *rpoB* ou d'un test Genotype CM® .Les résultats des TAG étaient positifs :
. pour 22 des 24 prélèvements à examen microscopique positif (92%) ce qui a permis de mettre en évidence des mycobactéries des espèces *M.tuberculosis* complex (n=17), *M.genavense* (n=2), *M.ulcerans* (n=2, par amplification de la séquence d'insertion spécifique d'espèce IS2404) et *M.simiae* (n=1)
. à *M.tuberculosis* complex pour 2 des 5 prélèvements à examen microscopique négatif (tous été positifs en culture à *M.tuberculosis* complex)
. pour 26 des 63 prélèvements (42%) pour lesquels l'examen microscopique n'avait pas pu être fait en raison d'un trop faible volume ce qui a permis d'identifier l'ADN de *M.tuberculosis* complex (n=25), et de *M.genavense* (n=1).
De plus :
- les 27 prélèvements à culture positive pour *M.tuberculosis* complex ont fait l'objet d'une recherche de résistance aux antituberculeux (cf. plus loin)
- 42 prélèvements ont fait l'objet d'une recherche directe de mutation responsable de la résistance à la rifampicine par étude du gène *rpoB* (séquençage ou test MTBDRplus®) (cf. plus loin).

D.1.2.2. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

Souches reçues pour tests de sensibilité

468 souches de mycobactéries ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques : 160 souches de *M.tuberculosis* complex (y compris les 27 souches isolées des prélèvements listés plus haut) **et 308 souches de mycobactéries atypiques.**

Tendances évolutives 2006-2010
Entre 2006 et 2010, le nombre de souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA pour tests de sensibilité aux antibiotiques a diminué de 12% pour les antibiogrammes de 1ère ligne (377 en 2006-07, 330 en 2009-10 mais a **augmenté de 52% pour les antibiogrammes de 2ème ligne** (167 en 2006-07, 260 en 2009-10) qui demandent beaucoup plus de travail (une douzaine de milieux non commercialisés à préparer localement pour chaque souche). Le nombre de **souches de mycobactéries atypiques reçues pour tests de sensibilité aux antibiotiques a aussi augmenté de 25%**.

Tests phénotypiques de sensibilité pour *M.tuberculosis* complex
Les tests de sensibilité sur les **160 souches de *M.tuberculosis* complex** ont été :
- un antibiogramme « **standard** » (antituberculeux **de 1ère ligne**) pour **34 souches**, pour vérification des résultats trouvés dans les laboratoires d'origine.
- un antibiogramme « **complet** », (antituberculeux **de 1ère ligne et de 2ème ligne**) pour **126 souches**, dont 45 souches envoyées pour multirésistance, 46 souches envoyées pour résistance à au moins l'isoniazide ou la rifampicine et 35 souches envoyées pour suspicion de multirésistance ou parce que les patients présentaient des intolérances médicamenteuses.

Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne des 160 souches testées en 2010 (Tableau 8) :
- 37% (n=59) étaient sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine (multisensibles)
- 63% étaient résistantes à au moins un de ces 4 antibiotiques dont 28% (n=51) étaient multirésistantes (MDR) c'est-à-dire résistantes à l'isoniazide et la rifampicine

Remarque : Si l'on tient compte des résultats de résistance obtenus pour les 97 souches qui avaient été isolées chez des patients sans antécédent de traitement, le taux de résistance « primaire » aux antituberculeux de 1ère ligne était de 51%. Ce chiffre est beaucoup plus élevé que celui mesuré par l'enquête annuelle menée à travers le réseau Azay-Mycobactéries (<10%, cf. plus loin). Ceci s'explique par le fait que les laboratoires adressent au CNR-MyRMA des souches pour tests de sensibilité en cas de résistance avérée ou fortement suspectée. D'ailleurs, entre 2006 et 2010, le nombre de souches multisensibles reçues a diminué de 120 à 59, ce qui reflète la volonté du CNR-MyRMA de se concentrer sur l'étude des souches résistantes et d'éviter de travailler sur des souches sensibles en dehors de demandes particulières (suspicion de résistance finalement non confirmée, intolérance aux antituberculeux de première ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats…). Ce

n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour tests de sensibilité que l'on peut établir des statistiques représentatives de la résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en France.

Tableau 8 : Phénotype de résistance aux antituberculeux de première ligne des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2010

		2006	2007	2008	2009	2010
Sensible*		120 (58%)	88 (52%)	86 (47%)	54 (32%)	59 (37%)
Résistant	H	8 (4%)	7 (4%)	12 (6%)	21 (12%)	13 (8%)
à au moins	S	8	6	9	6	7
1 antibiotique	R	2	1	6	5	4
mais non	E	-	-	-	1	0
multirésistant	H+S	15 (7%)	27 (16%)	17 (9%)	24 (14%)	23 (14%)
	H+E	-	-	-	2	1
	H+S+E	1	3	3	5	7
	R+S+E	-	-	-	1	-
Sous-total		**34 (16%)**	**44 (26%)**	**47 (25%)**	**65 (38%)**	**56 (35%)**
Multirésistant	H+R	7	12	10	8	5
	H+R+S	15 (14%)	8 (5%)	20 (22%)	21 (12%)	12
	H+R+E	6	E	‘	3	2
	H+R+S+E	25 (12%)	16 (9%)	18 (10%)	19 (11%)	26 (16%)
Sous-total		**53 (26%)**	**38 (22%)**	**52 (28%)**	**51 (30%)**	**45 (28%)**
Total général		**207**	**170**	**185**	**170**	**160**

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

<u>Résistance aux antituberculeux de seconde ligne</u> des 126 souches testées en 2010 (Tableaux 9 et 10) :

*- Résultats pour les **45 souches reçues pour multirésistance** :*

Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient les suivantes (**Tableau 9**) : streptomycine 3/4, éthambutol 2/3, éthionamide 3/4, cyclosérine 1/10, PAS 1/10, au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 1/10 à 1/5, fluoroquinolones 1/4. La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **<u>aussi</u>** aux fluoroquinolones **<u>et</u>** à au moins un aminoside de réserve (définition de l'ultrarésistance ou **XDR**) était de **13%** soit **6 cas de tuberculose XDR identifiées en 2010**.

Tableau 9 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches multirésistantes (MDR) testées au CNR-MyRMA de 2006 à 2010

	Années (n souches testées)	**2006 (53)**	**2007 (38)**	**2008 (51)**	**2009 (51)**	**2010 (45)**
a	Ethambutol	58	45	37	47	66
	Streptomycine	75	76	76	78	75
b	Amikacine	6	5	10	8	13
	Kanamycine	15	5	16	16	20
	Capréomycine	9	8	10	10	12
c	Fluoroquinolones	13	8	14	18	23
d	Ethionamide	34	45	57	43	75
e	PAS	15	5	6	12	9
	Cyclosérine	10	11	37	20	9
	Thiacétazone	42	30	26	39	52
	Linezolide	0	0	0	0	0

a : antibiotiques de première ligne autres que isoniazide et rifampicine
b : aminosides autres que streptomycine (entrent dans la définition de XDR)
c : entre dans la définition de XDR
d : ou prothionamide
e : antibiotiques bactériostatiques (de « dernière ligne »)

*- Résultats pour les **81 souches reçues pour antibiogramme complet dans un contexte autre que la multirésistance***

Les proportions de souches résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient beaucoup plus basses parmi les souches reçues dans un contexte autre que la multirésistance (ex. effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine) (**tableau 10**) que parmi les souches reçues pour multirésistance, ce qui n'est pas surprenant : moins de 5% à l'amikacine ou aux fluoroquinolones, environ 10% à l'éthambutol. Les proportion de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches non MDR mesurés à ce jour sont rassurants à ce jour car l'utilisation large de cette classe d'antibiotique dans la communauté pour de nombreuses indications (infections urinaires, respiratoires etc…) ferait craindre l'émergence de la résistance parmi les souches de *M.tuberculosis* complex sensibles aux antituberculeux de première ligne et donc à terme l'impossibilité d'utiliser cette classe pour les traitements de seconde ligne. Ces données devraient toutefois être confirmées sur un échantillon plus important. L'augmentation de la résistance à l'éthionamide en 2009 et 2010 est probablement dû à un problème de qualité de la poudre d'éthionamide disponible sur le marché et que nous utilisons pour préparer nos milieux pour antibiogramme. Nous sommes en train de remédier à ce problème.

Tableau 10 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches multirésistantes testées au CNR-MyRMA de 2006 à 2010 pour antibiogramme de 2e ligne, hors multirésistance (suspicions initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1re ligne…)

Années (n souches)	**2006 (41)**	**2007 (35)**	**2008 (38)**	**2009 (83)**	**2010 (81)**
Ethambutol	nd	6	8	10	13
Streptomycine	nd	54	42	39	43
Amikacine	0	3	0	0	3
Fluoroquinolones	0	0	5	1	0
Ethionamide	14	21	29	52	59
PAS	6	11	10	10	11
Thiacétazone	9	12	10	14	11

Tendances évolutives 2006-2010

Le nombre moyen de souches **MDR** reçues au CNR-MyRMA durant les 5 ans **est resté stable autour d'une médiane de 51 par an (Tableau 11)**, soit environ une par semaine, alors que le nombre total de cas de tuberculose à culture positive a diminué en France (cf DO et données des réseaux Azay-mycobactéries et CNR-MyRMA). Le nombre de souches « pré-XDR » (c'est-à-dire MDR résistantes aux fluoroquinolones ou à un des trois aminosides de réserve) n'a pas évolué de façon significative durant les 5 ans : 11 en 2006 (21% des MDR), 3 en 2007(8%), 12 en 2008 (24%), 9 en 2009 (18%) et 7 en 2010 (16%).

En revanche, le nombre de souches **XDR** qui était de 1 ou 2 par an de 2006 à 2008 (idem depuis 2002) a **augmenté à 4 souches en 2009 et 6 en 2010**. Pour la première fois en 2010 **la proportion de souches XDR a dépassé 10% des souches MDR** (13%). Cette augmentation est liée à des patients nés dans les pays de l'ex-URSS (**Tableau 12**).

Enfin, il faut remarquer que la proportion des souches MDR identifiées par l'enquête systématique auprès des laboratoires du réseau CNR-MyRMA et qui ont effectivement été reçues au CNR-MyRMA pour études *in vitro* a augmenté entre les périodes 2001-02 (~ 60 %) et 2008-09 (90-100 %) **(Tableau 11)**. **Le CNR-MyRMA reçoit donc maintenant la quasi-totalité des souches MDR de France.**

Si on considère la **distribution des souches MDR reçues au CNR-MyRMA entre 2006 et 2010 selon le pays de naissance des patients,** précisé pour 91% d'entre eux **(Tableau 13),** on constate que la majorité des souches sont isolées chez des patients nés en Afrique subsaharienne ou à Madagascar (n=78, soit 37%), en Europe Centrale et de l'Est (n=52, soit 24%), en France (n=32, soit 15%), en Asie (n=30, soit 14%), au Maghreb (n=11, soit 5%) et en Europe de l'ouest hors France (Portugal n=6,

Norvège n=1, total 3%). Quelques souches (n=5, 2%) proviennent de patients nés en Amérique du sud ou Caraïbes. Globalement, on note (a) une diminution des patients nés en France et (b) une augmentation des patients nés en Asie. Nous verrons plus loin (cf « Activités de surveillance ») une analyse des tendances évolutives du pays de naissance des patients MDR sur une période beaucoup plus longue (1992-2009).

Tableau 11 : Evolution de 2001 à 2010 du nombre de souches MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA. Exhaustivité de l'envoi des souches MDR au CNR-MyRMA

	Cas MDR recensés par le réseau CNR-MyRMA	Souches MDR reçues au CNR-MyRMA même année	Exhaustivité envoi souches (%) pendant même année	Souches XDR reçues CNR-MyRMA	% XDR parmi MDR reçues CNR-MyRMA
2001	48	29	60	0	0
2002	79	47	59	1	2
2003	77	60	78	2	3
2004	68	51	75	1	2
2005	65	60	92	1	2
2006	60	53	88	2	4
2007	44	38	86	2	5
2008	57	51	89	2	4
2009	51*	51	100*	4	8
2010	nd	45	nd	6**	13

*chiffre à confirmer (le CNR-MyRMA est en attente des réponses de quelques laboratoires)
** dont 1 souche d'un patient déjà connu les années précédentes (rechute)
nd : enquête en cours, donnée disponible fin 2011

Tableau 12 : Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyrMA de 2004 à 2010

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique subsaharienne	Europe de l'Est et exURSS	Total
2004		1 (Algérie)			**1**
2005			1 (Mali)		**1**
2006	1 (France)			1 (Tchétchénie)	**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, Géorgie*, Azerbaïdjan)	**6***

* 1 cas déjà identifié en 2009, rechute

Tableau 13 : Distribution des pays de naissance des patients pour les 216 des 238 souches MDR reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2010 (le pays de naissance n'a pu être précisé dans 22 cas, soit 9%)

Pays d'origine	2006	2007	2008	2009	2010	TOTAL
France	11	5	6	6	4	**32**
Portugal	0	2	2	0	2	**6**
Norvège	0	0	0	1	0	**1**
Total Europe Ouest	**11**	**7**	**8**	**7**	**6**	**39**
Roumanie	2	1	5	1	0	**9**
Moldavie	1	1	1	0	1	**4**
Ukraine	0	2	0	0	0	**2**
Arménie	1	1	2	3	0	**7**
Azerbaïdjan	0	0	0	0	1	**1**
Géorgie	2	1	1	4	1	**9**
Tchétchénie	1	1	5	3	4	**14**
Russie	2	0	1	2	1	**6**
Total Europe Est et ex. URSS	**9**	**7**	**15**	**13**	**8**	**52**
Algérie	1	3	2	1	1	**8**
Maroc	0	1	0	2	0	**3**
Total Maghreb	1	4	2	3	1	**11**
Cap-Vert	0	0	0	0	1	**1**
Mauritanie	0	0	0	1	0	**1**
Mali	0	0	0	1	0	**1**
Niger	0	0	1	0	0	**1**
Tchad	0	0	0	0	1	**1**
Sénégal	1	0	2	1	1	**5**
Guinée	3	1	2	0	2	**8**
Côte Ivoire	5	1	2	3	2	**13**
Ghana	0	0	0	1	0	**1**
Togo	1	0	0	0	0	**1**
Cameroun	0	2	2	0	2	**6**
Rep. Centrafricaine	1	1	0	0	0	**2**
Congo	3	1	4	4	1	**13**
RD Congo	4	5	1	0	2	**12**
Angola	1	1	1	1	2	**6**
Djibouti	1	0	0	0	0	**1**
Ethiopie	1	0	0	1	0	**2**
Soudan	0	0	0	1	0	**1**
Madagascar-Comores	0	1	0	1	0	**2**
Total Afrique hors Maghreb	**21**	**13**	**15**	**15**	**14**	**78**
Syrie	0	0	0	1	0	1
Inde	2	0	0	2	0	4
Pakistan	0	0	1	1	1	3
Sri Lanka	0	1	0	0	0	1
Népal	1	0	0	0	0	1
Chine	1	1	1	2	1	6
Tibet	0	1	0	0	3	4
Mongolie	0	0	0	0	2	2
Corée	0	0	0	2	0	2
Cambodge	0	0	1	0	0	1
Vietnam	0	0	1	2	2	5
Total Asie	**4**	**3**	**4**	**10**	**9**	**30**
Pérou	1	1	0	0	1	3
Chili	0	0	0	1	0	1
Haïti	0	0	0	0	1	1
Total Amériques	**1**	**1**	**0**	**1**	**2**	**5**
GRAND TOTAL	**48**	**35**	**44**	**49**	**40**	**216**

Tests phénotypiques de sensibilité des mycobactéries atypiques, tendances évolutives 2006-2010

***M.avium-intracellulare* complex** : parmi les 178 souches reçues en 2010 (96 *M.avium* et 82 *M.intracellulare*), 145 ont fait l'objet d'un antibiogramme dont 15 (8%) étaient résistantes à la clarithromycine (CMI > 16 mg/l en milieu 7H9). Sur la période 2006 à 2010, la proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 7%, soit 42 souches sur les 624 testées, Les souches résistantes concernaient des patients ayant des antécédents de traitement pour 31 cas parmi les 132 patients ayant des antécédents connus de traitement soit 23% de résistance secondaire.

M.xenopi : parmi les 52 souches reçues en 2010, 40 ont fait l'objet d'un antibiogramme. Aucune n'était résistante à la clarithromycine. Seuls 6 patients avaient des antécédents de traitement. Entre 2006 et 2010, seules 2 souches de *M.xenopi* ont été trouvées résistantes à la clarithromycine parmi 186 souches testées (1%). Ces souches ont été isolées chez 2 des 20 patients ayant des antécédents de traitement (10%).

***M.kansasii* :** Parmi les 24 souches reçues en 2010, 21 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante à la rifampicine y compris pour les 4 patients ayant des antécédents de traitement. Entre 2006 et 2010, aucune des 107 souches reçues n'étaient résistantes à la rifampicine y compris pour les 12 patients ayant des antécédents de traitement

Espèces à croissance rapide : Les 17 souches de *M.chelonae* testées en 2010 étaient sensibles à la clarithromycine. En revanche, cette proportion n'était que de 12/27 pour *M.abscessus* sensu stricto, 6/9 pour *M.bolletii,* 2/3 pour *M.massiliense*, en cohérence avec la présence naturelle d'un gène *erm* conférant une résistance inductible aux macrolides chez ces espèces (cf. § recherche sur les mécanismes de résistance). Les modifications des critères de classification de ces espèces durant la période 2006-2010 rend difficile la synthèse des résultats des tests de sensibilité.

D.1.2.3. Détection de mutations impliquées dans la résistance

- En 2010, 201 souches et 42 prélèvements ont été soumis à la détection rapide de mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis* à la rifampicine et à 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.
- 22 souches de mycobactéries atypiques ont été soumises à la détection moléculaire rapide de la résistance à des antibiotiques antimycobactériens

Tendances évolutives 2006-2010

Le nombre **de recherches de mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis* a augmenté de 50% entre 2006 et 2008 puis s'est maintenu depuis autour de 1000 par an (Tableau 14).** Ces dernières années ont de plus été celles d'une diversification du diagnostic moléculaire de la résistance aux antituberculeux. Le CNR-MyRMA est passé de l'analyse de 3 gènes (*rpoB, gyrA* et *pncA*) permettant d'étudier la sensibilité à 3 antituberculeux (rifampicine, fluoroquinolones et pyrazinamide) à celles de 10 gènes (*rpoB, gyrA, gyrB, pncA, katG, inhA, rrs, embB, ethA, ethR)* permettant d'étudier la sensibilité à 9 antituberculeux (rifampicine, fluoroquinolones, pyrazinamide, isoniazide, éthionamide, éthambutol, amikacine, kanamycine, capréomycine).

Mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis*, tendances évolutives 2006-2010

Rifampicine (RIF) *:*

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBR*plus*® complété par l'amplification et le séquençage du gène *rpoB* ont permis d'identifier des **mutations dans *rpoB* pour 54 des 201 (27%) souches** testées en 2010 (**Tableau 15**) :
- 37 mutations S531L (68%) identifiées directement par GenoType MTBR*plus*®
- 8 mutations H526Y ou H526D (15%) identifiées directement par GenoType MTBR*plus*®
- 1 mutation D516V (2%) identifiées directement par GenoType MTBR*plus*®
- Pour 8 souches, la bandelette GenoType MTBR*plus*® a permis d'établir qu'il y avait une mutation dans *rpoB* mais pas d'identifier précisément les mutations. Le séquençage du gène *rpoB* a permis de préciser la nature de la mutation pour ces souches : L511P, n=3 (dont une cumulait une 2ème mutation S509I) ; L533P, n=3 ; H526R, n=1 et H526S, n=1.

La **part dominante de la mutation S531L du gène *rpoB* dans la résistance à la rifampicine reste de l'ordre de 50 à 75% depuis 2006**, en accord avec les données publiées à l'étranger. Les souches résistantes à la rifampicine pour lesquelles on n'a pas détecté de mutation dans le gène *rpoB* sont

exceptionnelles (moins de 1%), ce qui fait de la recherche de mutations dans ce gène une excellente approche rapide de la résistance à la rifampicine et même de la multirésistance en raison de la rareté des souches monorésistantes à la rifampicine (cf. § surveillance de la résistance).

Tableau 14 : Nombre de recherches de mutations dans les gènes codant pour la résistance aux antituberculeux (rifampicine, isoniazide, pyrazinamide, fluoroquinolones, éthionamide) effectuées au CNR-MyRMA sur les souches reçues de 2006 à 2010

	2006	2007	2008	2009	2010
rpoB (rifampicine)	184	197	276	254	201
katG-inha (isoniazide)	182	179	276	249	198
pncA (pyrazinamide)	142	138	172	164	137
gyrA/*gyrB* (fluoroquinolones)	117/12	105/105	150/150	129/129	128/128
ethA/ethR (éthionamide)	-	-	-	-	50/50
rrs (aminosides)	-	-	-	-	56
emB(éthambutol)	-	-	-	-	62
Total	**637**	**724**	**1024**	**925**	**1010**

Détection directe de mutations conférant la résistance à la rifampicine sur prélèvements
La détection directe de la résistance à la rifampicine a été menée sur 42 prélèvements par étude du gène *rpoB* (séquençage ou test MTBDR*plus*). Un résultat a été obtenu dans 41 cas : 11 fois en faveur de la résistance et 30 fois en faveur de la sensibilité. Sur les 11 résultats en faveur de la résistance, 10 ont été confirmés ultérieurement par l'antibiogramme phénotypique. Le dernier résultat était discordant et correspondait à un patient en cours de traitement et chez lequel un processus de sélection de mutants résistants était probablement en cours mais pas suffisamment avancé pour se traduire par la résistance in vitro. Inversement, 1 des 30 résultats en faveur de la sensibilité a été infirmé par l'antibiogramme phénotypique. Le séquençage complet du gène *rpoB* effectué sur la souche de ce patient n'a pas permis de mettre en évidence de mutation dans ce gène malgré une CMI élevée (> 16 mg/l). C'est un des cas exceptionnels de résistance confirmée à la rifampicine pour lesquelles nous n'avons pas détecté de mutation dans *rpoB* (cf plus haut).

Tableau 15 : Distribution des mutations du gène *rpoB* identifiées dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2010 pour détection moléculaire de la résistance à la rifampicine (techniques : GenoType®MTB-DRplus, séquençage du gène *rpoB*)

Mutation dans RpoB	2006	2007	2008	2009	2010
S531L	26	29	34	41	37
H526Y	2	2	5	7	4
H526D	3	3	2	5	4
H526N ou T ou L ou S ou R	5	2		2	2
D516V	9	1	3	8	1
D516Y	4			2	
Délétion N519				1	
L511P				1	3**
Insertion entre les positions 531 et 532				6	
S531W	1			3	
L533P	3			2	3
Mutation entre les positions 510 et 533*		1	14	2	
Total avec mutation	**53**	**38**	**58**	**80**	**54**
Pas de mutation	131	159	218	174	147
Total général	**184**	**197**	**276**	**254**	**201**

* position de la mutation non précisée
** dont 1 avec en plus mutation S509I

Isoniazide (INH)
Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBR*plus*, complété par le séquençage des gènes *katG*, *inhA* et du promoteur d'*inhA*, a permis d'identifier des **mutations dans *katG* et *inhA* pour 89 des 198 (45%) souches testées en 2010** (**Tableau 16**) :
- 57 fois, une mutation en 315 dans *kat*G (64%), toujours corrélées avec une résistance phénotypique à haut niveau à INH, dont 49 mutations isolées et 8 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA* (en position -8, n=1 ; en position -15, n=5 ; en position -17, n=2).
- 25 fois, une mutation de type « -15 c->t » dans la région régulatrice du gène *inhA* (28%), corrélée, lorsqu'elle est isolée, avec une résistance phénotypique à bas niveau à INH. Une de ces souches avait aussi une mutation du gène *inhA* au niveau du codon 94 (S94A), connue également pour être associée à un bas niveau de résistance
- 7 fois, une mutation (8%) dans le gène *katG* à une position autre que celle du codon 315. Pour ces souches, qui présentent des niveaux de résistance phénotypique variables à INH, le test MTBDR*plus* ne peut pas mettre en évidence la mutation ce qui impose le séquençage complet des gènes *katG* et *inhA*.

La part dominante de la mutation S315T dans le gène *katG* reste de l'ordre de 50 à 75% depuis 2006, en accord avec les données publiées à l'étranger. **Les mutations isolées de type « -15 c->t » dans la région régulatrice du gène *inhA* représentent un quart des cas. Les souches pour lesquelles on n'a pas détecté de mutation ni dans *katG* ni dans *inhA* et sa région régulatrice représentent 10 à 15 % de l'ensemble des souches résistantes à l'isoniazide** testées selon les années mais moins de 5 % des souches MDR.

Tableau 16 : Distribution des mutations des gènes *katG* et *inhA* dans les souches étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2010 pour détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide (techniques : GenoType®MTB-DRplus et séquençage des gènes *katG*, *inhA* et promoteur du gène *inhA*)

Mutation	2006	2007	2008	2009	2010
KatG S315T	73*	58*	54	73	49
KatG 315 autre que S>T	1*	2*	1	2	-
KatG autre que S315	7	6	9	14	7
Promoteur inhA	12	27	17	28	24
dont -15	*1*	*27*	*16*	*28*	*24*
InhA	2	1		2	1**
KatG S315T **et** promoteur inhA	nd*	nd*	12	9	8
dont -15			*5*	*4*	*5*
Autre combinaison KatG **et** InhA				1	
Total mutations	**95**	**94**	**93**	**129**	**89**
Pas de mutation	87	85	183	120	109
Total général	**182**	**179**	**276**	**249**	**198**

* en 2006 et 2007, les mutations dans InhA n'ont pas été recherchées dans les souches mutantes dans KatG, en conséquence, il n'a pas été précisé si ces souches sont des simples mutants KatG ou des doubles mutants KatG + InhA
** en plus mutation inhA -15 c->t

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 137 souches en 2010** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).
En raison de l'arrêt de fabrication par la société Biorad des milieux contenant du pyrazinamide et une base de Lowenstein à PH acide, nous avons dû arrêté momentanément le test phénotypique et la détection de la résistance a été faite grâce aux données de la littérature sur l'impact des mutations sur la résistance et la modélisation tridimensionnelle de la pyrazinamidase (cf travaux de recherche).
Parmi 137 souches, 33 (24%) avaient une mutation du gène *pncA* (**Tableau 17**) dont 2 *M.bovis* (résistance naturelle par « mutation » H57D). Il faut noter la très grande diversité des mutations

identifiées dans PncA, tant en nature qu'en position sur la protéine, diversité qui rend difficile l'interprétation de l'effet des mutations sur la résistance.

Tableau 17 : Distribution des mutations du gène *pncA* dans les 137 souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA en 2010 pour détection moléculaire de la résistance au pyrazinamide (technique : séquençage du gène *pncA*)

Mutation	N
R2W	1
V9G	1
Q10STOP	1
Q10K	2
Q10P	3
H43P	1
H57D*	2
W68G	1
A79V	2
F81S	1
T87M	1
K96Q	1
G97C	1
G97R	2
Y103S	1
V125G	1
V139A	2
T142A	1
T142M	1
T153N	1
G162D	1
insertion dans PncA	5
Total mutations	**33**
Pas de mutation	104
Total général	**137**

**M. bovis*

Fluoroquinolones (FQ)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®TBR*sl*, complété par le séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour l'ADN gyrase, cible des fluoroquinolones, a été effectué **pour 128 souches reçues en 2010** (souches MDR, souches suspectes d'être MDR, par exemple, après rechute) dont 23 étaient résistantes.

Des **mutations** (**Tableau 18**) ont été détectées chez **20 des 128 souches** (16%) dans **GyrA** (16 cas) ou **GyrB** (4 cas). Aucune souche ne présentait de double mutation GyrA et GyrB.
La plupart des souches (n=13) avaient des mutations déjà connues pour entraîner la résistance aux fluoroquinolones (D82N, A83V, S84P, D87A, G ou Y dans GyrA ; D426N, E466A dans GyrB ; **(numérotation *E.coli*)**. Quelques souches avaient des mutations décrites comme n'étant pas associées à la résistance aux fluoroquinolones : 5 dans GyrA (T73A) et 1 dans GyrB (A469V).
La mutation S396I dans GyrB a été détectée pour la première fois en 2010 et son rôle dans la résistance aux fluoroquinolones n'est pas encore connu.
Nous n'avons pas trouvé de mutation pour les 108 souches dont la sensibilité aux fluoroquinolones a été confirmée par l'antibiogramme phénotypique. **La spécificité de la détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones a donc été de 100 % en 2010**.

On voit dans le **tableau 18** que les **mutations responsables de la résistance aux fluoroquinolones sont très variées mais que celles aux positions 94 et 90 de *gyrA* dominent** et représentent respectivement 30% et 10 % du total de souches résistantes reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2010.

Tableau 18 : Distribution des mutations des gènes *gyrA* et *gyrB* dans les souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA de 2006 à 2010 pour détection moléculaire de la résistance au fluoroquinolones (technique : séquençage)

Gène	Mutation*	2006	2007	2008	2009	2010
gyrA	T80A**		2	2	3	5
	G88C		1			
	D89N					1
	A90V	2	1	2	2	3
	S91P				2	1
	D94A			3		3
	D94H			1	1	
	D94G	4***		3	1	2
	D94N	1			2	
	D94Y				1	1
	Q101E				1	
	T80A** + A90G	3				
	T80A** + A90E		1			
	A90V + D94Y				1	
gyrB	S470I					1
	P478A			1		
	R485H		1			
	S486Y				1	
	D500A			1		
	D500N					1
	A506G				1	
	N538D				1	
	E540V				1	
	E540A					1
	A543V				1	1
	A547V				1	
	G551R				1	
	G559A**		2			
Total mutations		**10**	**8**	**13**	**21**	**20**
Pas de mutation		107	97	137	108	108
Total général		**117**	**105**	**150**	**129**	**128**

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

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

Ethionamide :
Le séquençage des gènes *ethA* et *ethR*, codant pour la monooxygénase EthA et son régulateur EthR, a été effectué **pour 50 souches en 2010** (1ère année de l'introduction de ce test). Des mutations (**Tableau 19**) ont été détectées chez 20 souches (40%). On note une grande diversité des mutations, parmi lesquelles 5 délétions au sein du gène *ethA*, 2 codons STOP entrainant une interruption prématurée de la protéine EthA) et 3 mutants EthA cumulant une seconde mutation dans EthR.

Kanamycine, amikacine et capreomycine :
Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBR*sl*® 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, **56 souches ont été étudiées en 2010** (1ère année de l'introduction de ce test), montrant la présence d'une **mutation** A1401G pour **6 d'entre elle**s (11%).

Ethambutol :
Le système d'amplification-hybridation GenoType® MTBR*sl* a également été utilisé pour la recherche de mutations dans le gène *embB* à la position 306 qui a été associée à la résistance à l'ethambutol. Au total, **62 souches ont été étudiées en 2010** (1ère année de l'introduction de ce test), montrant la présence d'une **mutation** du codon EmbB-306 pour **27 d'entre elles** (45%): M306V (n=21) et M306I (n=6).

Tableau 19 : Distribution des mutations des gènes *ethA* et *ethR* dans les 50 souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA en 2010 pour détection moléculaire de la résistance à l'ethionamide (technique : séquençage)

Gène	EthA	EthR	N
ethA	I9T		1
	S15P		1
	C27W		1
	L62I		1
	D95N et N379D		1
	L272P		1
	S266R		1
	Q269STOP		2
	H307Y		1
	T314I		1
	R471P		1
	délétion		5
ethA et ethR	W167S et S266R	S156R	2
	Y141C	M167I et Q168K	1
Total mutations			**20**
Pas de mutation			30
Total général			**50**

*Numérotation de *E.coli*

Mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries atypiques

En 2010, 22 souches ont été soumises à la détection moléculaire rapide de la résistance à la clarithromycine par recherche de mutations au niveau des nucléotides en position 2058 et 2059 de l'ARN 23S. L'analyse a porté sur des souches de *M.avium* (n=7), *M.intracellulare* (n=8), *M.massiliense* (n=1), *M.simiae* (n=1), *M.chimaera* (n=1), *M.abscessus* (n=3) et *M.chelonae* (n=1).

Cinq de ces souches (23%) portaient une mutation dans la région 2058-2059 de l'ARN 23S : 2058 A>C (*M.avium*, n=1), 2058 A>G (*M.intracellulare*, n=2), 2058 A>T (*M.massiliense*, n=1), 2059 A>G (*M.simiae*). Toutes ces souches étaient résistantes à la clarithromycine et ont été isolées de patients ayant des antécédents de traitement par macrolides.

D.1.2.4. Prélèvements pour diagnostic de la lèpre et détection de mutations impliquées dans la résistance aux antilépreux

En 2010, nous avons reçu 25 prélèvements pour diagnostic de lèpre dont 7 étaient positifs à l'examen microscopique. Ces 7 prélèvements positifs correspondaient à 3 patients de Nouvelle Calédonie (3 nouveaux cas) et 4 vus en consultation ou hospitalisés en France métropolitaine (1 cas à Orléans, 1 cas à Paris-Tenon, 1 cas à Paris-Saint Louis et 1 cas à Toulouse). Ces 4 derniers cas étaient importés, les patients étant natifs de territoires où la lèpre est encore présente (respectivement, dans l'ordre : Mayotte, Bénin, Inde, Réunion). Au total, les cas se répartissaient en 6 nouveaux cas, 1 malade suivi sous traitement (cas de résistance à l'ofloxacine de 2009) et 1 cas de rechute (patient du Bénin suivi à Paris-Tenon).

Les tests génétiques (amplification-séquençage des gènes *rpoB*, *folP* et *gyrA*) effectués sur les biopsies cutanées ont donné les résultats suivants :

- pour les 6 nouveaux cas (recherche de résistance « primaire ») : 4 souches ont été considérées comme sensibles (pas de mutation) à la rifampicine, aux sulfones et aux quinolones, et 2 souches étaient résistantes aux sulfones (mutation P55L et mutation T53A dans *fol*P). Ces deux souches étaient isolées de malades de Nouvelle Calédonie.
- pour le cas de rechute de Paris-Tenon, la souche était sensible aux antilépreux (pas de résistance « secondaire »).

Par ailleurs, nous avons confirmé un cas de résistance probable aux fluoroquinolones chez le patient diagnostiqué pour un nouveau cas de lèpre en Nouvelle Calédonie en 2009 (mutation A91V). Il s'agit

d'un cas exceptionnel de résistance « primaire » aux fluoroquinolones chez un patient traité par ciprofloxacine pour une prostatite alors que l'infection lépreuse n'était pas encore diagnostiquée.

En 2010, nous n'avons pas eu de résultat positif in vivo (multiplication chez la souris) pour les prélèvements reçus en 2009. En effet, les cultures chez la souris, qui se positivent en général après un an, sont restées négatives pour les 7 prélèvements positifs à l'examen microscopique reçus en 2009. C'est pourquoi nous allons modifier le protocole de culture in vivo car, bien que les délais de transport des lépromes venant des DOM-TOM (en particulier de la Nouvelle Calédonie) aient été un peu améliorés, la viabilité des bacilles après transport reste encore trop faible et nécessite l'emploi de souris plus sensibles à l'infection (cf. projet).

Tendance évolutive 2006-2010
Le nombre de prélèvements pour suspicion de lèpre chez des patients vus en France (métropole ou DOM-TOM) reçus au CNR-MyRMA a augmenté de 10 par an en 2006-07 à 20 en moyenne en 2008-10 et les nombre de cas confirmés de 3 à 7. Au total, 5 des 24 cas positifs testés étaient résistants aux sulfamides (dapsone), 1 aux quinolones mais aucun à la rifampicine (Tableau 20)

Tableau 20 : Prélèvements de tissus reçus au CNR-MyRMA de 2006 à 2010 pour diagnostic de lèpre et tests génotypiques de sensibilité

	2006	2007	2008	2009	2010
N total	**10**	**10**	**18**	**17**	**25**
N cas positifs pour *M.leprae*	**5**	**2**	**7**	**6**	**7**
Nouveau cas	4	0	5	5	6
Rechutes	1	2	2	1	1
Lieu du diagnostic					
France Métropolitaine	0	0	2	2	4
DOM-TOM	5	2	5	4	3
Pays d'origine des patients					
DOM-TOM	5	2	5	2	5
Afrique			1	2	1
Asie			1		1
Europe				2	
Résistance aux anti-lépreux (N cas muté / n cas testés)					
Dapsone	1/4	0/2	1/4	1/6	2/7
Rifampicine	0/5	0/2	0/4	0/6	0/7
Ofloxacine	0/3	0/2	0/3	1/6	0/7

D.1.3. Contrôles de qualité externe organisés par le CNR-MyRMA

Nous organisons depuis 2003 un contrôle de qualité externe (CQE) des tests de sensibilité aux antituberculeux dans le cadre de l'enquête sur la résistance primaire et secondaire effectuée chaque année par les laboratoires du réseau Azay-mycobactéries (cf plus loin « Surveillance de la résistance primaire et secondaire »). Ce CQE est mené tous les 2 ans ce qui nous permet de présenter dans le **tableau 21** les résultats obtenus en 2003, 2005, 2007 et 2009. Le dernier contrôle (2009) a concerné 31 laboratoires de CHU du réseau «Azay» ainsi que deux laboratoires privés qui ont la plus forte activité de mycobactériologie (laboratoires CERBA et BIOMNIS).
L'analyse des résultats est exprimée antibiotique par antibiotique en sensibilité et spécificité de détection de la résistance pour les 4 souches du CQE (**Tableau 21**). Les résultats sont de très bonne qualité pour l'isoniazide, la rifampicine et l'éthambutol mais moins satisfaisants pour la streptomycine. Ces résultats sont néanmoins supérieurs aux valeurs cibles recommandées par l'OMS (**Tableau 21**).
Une enquête sur les méthodes utilisées pour les tests de sensibilité aux antituberculeux, associée à chaque exercice de CQE, a permis de montrer le remplacement progressif des tests en milieux solides (méthode de proportion sur milieux à l'oeuf) par ceux faits en milieux liquides (méthode des proportions en MGIT-960TB ou BacTAlert) : 54% de test en milieu liquide en 2003, 75% en 2005, 80% en 2007 et 81% en 2009.

Ces résultats sont très importants pour la vie du réseau Azay-mycobactéries. Ils sont présentés et discutés lors de la réunion annuelle du réseau.

Tableau 21 : Résultats du contrôle de qualité des tests de sensibilité aux antituberculeux organisé par le CNR-MyRMA pour le réseau Azay-mycobactéries, en 2003, 2005, 2007 et 2009

A. sensibilité ou % de bonnes réponses pour la détection de la résistance

	2003	2005	2007	2009
Isoniazide	100	87	100	100
Rifampicine	100	100	100	100
Ethambutol	100	100	100	100
Streptomycine	100	97	97	95

B. spécificité ou % de bonnes réponses pour la détection de la sensibilité

	2003	2005	2007	2009
Isoniazide	100	99	100	98
Rifampicine	99	100	99	100
Ethambutol	99	98	100	99
Streptomycine	89	100	100	96

C. sensibilité et spécificité comparées du CQE 2009 et des valeurs cibles recommandées par l'OMS (Int J Tuberc Lung Dis 6(9):748-756)

Antituberculeux	Sensibilité		Spécificité	
	CQE 2009	OMS	CQE 2009	OMS
Isoniazide	100	97	98	97
Rifampicine	100	99	100	98
Ethambutol	100	90	99	92
Streptomycine	95	93	96	92

D. 2. Contribution à la surveillance épidémiologique ou à l'alerte

D.2.1. Activités de surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux anti-tuberculeux

D.2.1.1. Surveillance de la résistance primaire et secondaire à travers le réseau Azay-mycobactérie, tendances évolutives depuis 1995

Les données recueillies en 2010 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2009 par les 38 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries, soit trois laboratoires de plus qu'en 2008 (2 CHU de la région parisienne). Ces 38 laboratoires ont colligés en 2010 les données concernant **1574 cas de tuberculose à culture positive** diagnostiqués en 2009. Un test de sensibilité à au moins rifampicine et isoniazide a été réalisé pour 1564 des 1574 cas colligés. **La distribution des cas par région est donnée dans le** Tableau 22.

Tableau 22 : Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M.tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie de 2006 à 2009 : distribution régionale des cas à culture positive. Pour 2009, les données sont exprimées en nombre de cas et en %

Régions	2006	2007	2008	2009	
Alsace	41	35	40	50	3,2%
Aquitaine	144	116	106	126	8,1%
Auvergne	0	29	23	29	1,8%
Bourgogne	15	23	29	24	1,5%
Bretagne	16	14	22	17	1,1%
Centre	21	18	24	15	1%
Champagne Ardennes	19	6	16	15	1%
Corse	0	0	0	0	0%
Franche-Comté	16	16	17	12	0,8%
Ile de France	702	712	712	780	49,4%
Languedoc-Roussillon	67	57	53	31	1,9%
Limousin	16	13	23	14	0,9%
Lorraine	25	28	36	28	1,8%
Midi-Pyrénées	49	91	57	55	3,5%
Nord-Pas de Calais	47	35	35	44	2,7%
Normandie Basse	34	25	34	34	2,2%
Normandie Haute	49	41	40	36	2,3%
Provence ACA	0	37	39	38	2,4%
Pays de Loire	69	74	79	63	4%
Picardie	28	24	26	22	1,4%
Poitou-Charentes	16	16	18	23	1,5%
Rhône-Alpes	135	139	141	117	7,5%
TOTAL	**1509**	**1549**	**1570**	**1574**	**100%**

Pour 1410 des 1564 cas pour lesquels la sensibilité à rifampicine et isoniazide a été éprouvée, les renseignements sur les antécédents de traitement ont permis de stratifier les données selon les recommandations de l'OMS (**Tableau 23**).

Caractéristiques générales des cas de tuberculose recensés

La proportion des cas de tuberculose à culture positive étudiés par le réseau Azay-mycobactéries en 2009 en fonction des **antécédents de traitement (6,9%), du pays de naissance (57,4% nés à l'étranger) et du statut VIH (8,4%)** est présentée dans la **Figure 4**.

L'analyse de l'évolution depuis 1995 montre :

- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de la **proportion des cas diagnostiqués chez des patients ayant des antécédents de traitement** ce qui est en faveur d'une prise en charge convenable de la tuberculose en France (indicateur de qualité),
- une **augmentation régulière 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 57% en 2009. La plupart des pays d'Europe de l'Ouest (cf rapports OMS) constatent une évolution de ce type,
- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de **la proportion des cas diagnostiqués chez les patients VIH+** autour de 8-10 %, ce qui montre que la co-infection tuberculose-VIH est peu fréquente en France et que l'impact de l'épidémie du **VIH sur l'épidémiologie de la tuberculose est modeste.**

Tableau 23 : Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2009 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 (%)
Souches testées	1304 (100%)	494 (100%)	763 (100%)	106 (100%)	45 (100%)	60 (100%)
Sensible	1171 (89,8%)	459 (92,9%)	670 (87,8%)	79 (74,5%)	38 (84,4%)	40 (66,7%)
Résistant	133 (10,2%)	35 (7,1%)	93 (12,2%)	27 (25,5%)	7 (15,6%)	20 (33,3%)
- dont résistant au moins à :						
SM	84 (6,4%)	27 (5,5%)	55 (7,2%)	21 (19,8%)	5 (11,1%)	16 (26,7%)
INH	79 (6,1%)	13 (2,6%)	64 (8,4%)	18 (16,9%)	4 (8,9%)	14 (23,3%)
RMP	14 (1,1%)	2 (0,4%)	12 (1,6%)	15 (14,2%)	2 (4,4%)	13 (21,7%)
EMB	14 (1,1%)	2 (0,4%)	11 (1,4%)	4 (3,8%)	1 (2,2%)	3 (5,0%)
- dont monorésistant à :						
SM	48 (3,7%)	21 (4,2%)	25 (3,3%)	8 (7,6%)	2 (4,4%)	6 (10,0%)
INH	39 (3,0%)	6 (1,2%)	31 (4,1%)	2 (1,8%)	1 (2,2%)	1 (1,6%)
RMP	1 (0,1%)	0	1 (0,1%)	1 (0,9%)	1 (2,2%)	0
EMB	4 (0,3%)	1 (0,2%)	2 (0,3%)	0 (0,0%)	0	0
- dont MDR	13 (1,0%)	2 (0,4%)	11 (1,4%)	14 (13,2%)	1 (2,2%)	13 (21,7%)

SM : streptomycine ; INH : isoniazide ; RMP : rifampicine ; EMB : éthambutol
Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 157 cas
Le pays de naissance était inconnu pour 79 cas
La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 192 cas

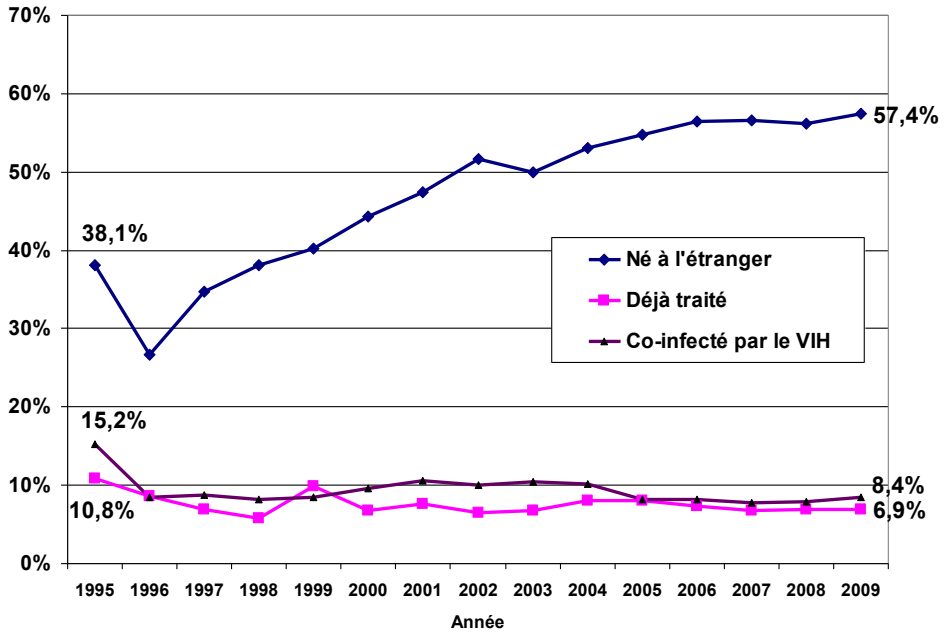


Figure 4 : Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2009

Pourcentage global de résistance « primaire »

Chez l'ensemble des 1304 malades sans antécédent de traitement (nouveaux cas), le pourcentage de résistance ("**résistance primaire**") à **au moins un des 4 antituberculeux de première ligne était en 2009** de **10,2% (Tableau 23, Figure 5)**. **Ce chiffre est globalement stable depuis 1995.**

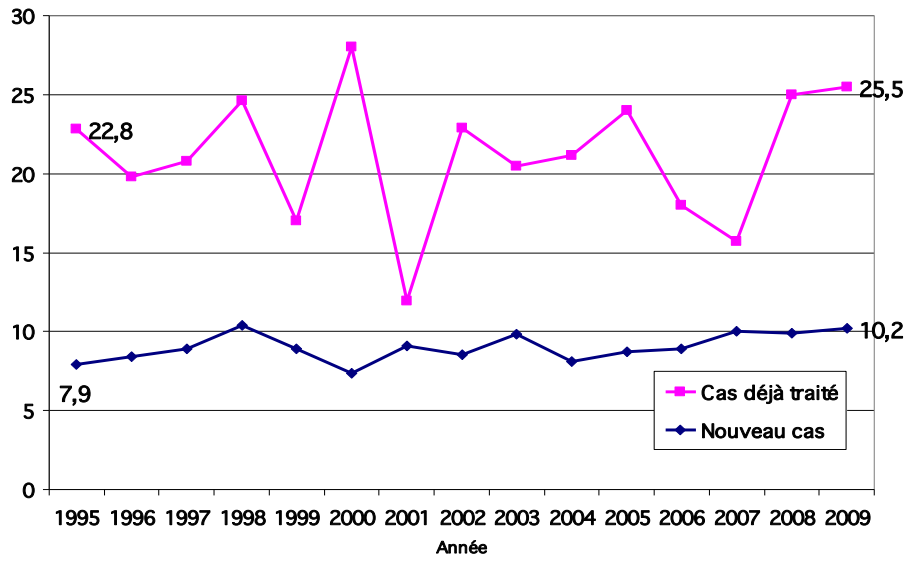


Figure 5 : Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance primaire) et les cas déjà traités (résistance secondaire). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2009

Le pourcentage de résistance primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (Figure 6, Tableau 23) était beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 6,1%) et la streptomycine (SM 6,4%) que pour la rifampicine (RMP 1,1%) et l'éthambutol (EMB, 1,1%). **Il faut noter une** augmentation modérée mais significative de la résistance primaire à INH depuis le début de la surveillance en 1995 **(3,7% en 1995 à 6,1% en 2009), ce qui justifie de maintenir en France les recommandations thérapeutiques de quadrithérapie pour les nouveaux cas. Une analyse plus détaillée des raisons de cette augmentation est en cours.**
Comme les années précédentes, la quasi totalité des souches résistantes à la rifampicine rapportées en 2009 chez les patients sans antécédent de traitement (13/14) étaient aussi résistantes à INH (multiresistance). La proportion de cas **multirésistants « primaires »** mesuré en 2009 au travers du réseau Azay-mycobactéries était donc de **1,0%**, chiffre identique à celui de 2007 et légèrement inférieur à celui de 2008 (1,2%).

Résistance primaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance primaire à au moins un antituberculeux chez les 494 malades nés en France (**Tableau 22**) était de 7,1% alors qu'il était de 12,2% chez les 763 nés à l'étranger (p<0,01). **Les pourcentages de résistance primaire étaient plus élevés chez les malades nés à l'étranger que chez ceux nés en France** pour INH (8,4% vs 2,6% ; p<0,01), et RMP (1,6% vs 0,4% ; p=0,06). Comme les autres années, **la majorité (11 sur 13) des cas multirésistants « primaires » concernaient des malades nés à l'étranger**.

Pourcentage global de résistance « secondaire»

Chez les 106 malades ayant déjà reçu un traitement antituberculeux (cas déjà traités), le pourcentage de résistance (résistance "secondaire" ou "acquise") à au moins un des 4 antituberculeux était de 25,5%, soit 2,5 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas (**Figure 6, Tableau 23**). Ce pourcentage est un des plus élevé observé depuis le début de la surveillance en 1995 mais les fluctuations enregistrées en limitent l'interprétation. Le pourcentage de résistance "secondaire" à INH observé en 2009 (16,9%) est comparable à celui de 2008 (16,4%) (**Figure 7**). Le pourcentage de résistance secondaire à RMP (14,2%) reste plus de 10 fois supérieur au pourcentage de résistance primaire à cet antibiotique (1,1%). Contrairement à ce qu'on a vu plus haut pour la résistance primaire (**Figure 6**), les pourcentages de résistance secondaire sont proches pour RMP et INH (**Figure 7**).

Comme les années précédentes, la quasi totalité des souches résistantes à la rifampicine chez les patients avec antécédent de traitement (14/15) étaient aussi résistantes à INH (multiresistance). La proportion de cas multirésistants « secondaires » mesuré en 2009 au travers du réseau Azay-mycobactéries de 13,2%, soit 10 fois plus élevée que la proportion des cas multirésistants « primaires ».

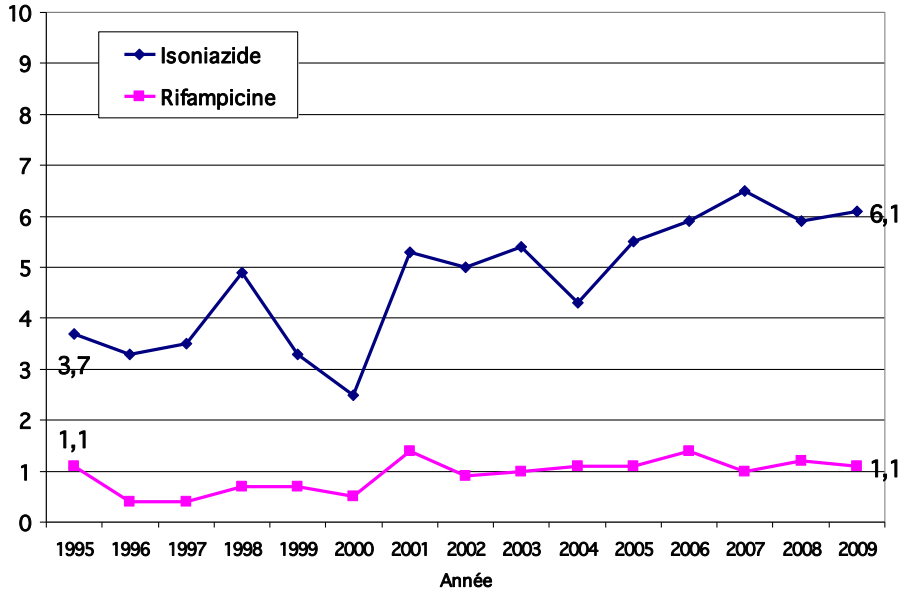


Figure 6 : Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2009

Résistance secondaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance "secondaire" à au moins un antituberculeux était de 15,6% chez les 45 malades nés en France (**Tableau 23)** et de 33,3% chez les 62 malades nés à l'étranger (p=0,05). Le pourcentage de **résistance 2aire était plus élevé chez les malades nés à l'étranger pour chaque antituberculeux** et la différence était statistiquement significative pour la streptomycine (26,7% vs 11,1%, p=0,04), et la rifampicine (21,7% vs 4,4%, p=0,01), et à la limite de la significativité pour l'isoniazide (23,3% vs 8,9%, p=0,052). **Treize des 14 cas de multirésistance secondaire concernaient des malades nés à l'étranger** dont 1 seul était séropositif pour le VIH.

Monorésistance à la rifampicine

Il y avait en 2009 2 cas de "mono-résistance" à RMP (résistance à RMP, sensibilité à INH), l'un 1aire et l'autre 2aire (**Tableau 23)**, tous 2 chez des patients co-infectés par le VIH. Le nombre de cas "mono-résistants" à RMP est resté stable depuis 2006 (3 cas, 1 primaire et 2 secondaire), 2007 (1 cas secondaire) et 2008 (4 cas secondaires) et tous concernaient des patients co-infectés par le VIH.

Résistance secondaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance "secondaire" à au moins un antituberculeux était de 15,6% chez les 45 malades nés en France (**Tableau 23)** et de 33,3% chez les 62 malades nés à l'étranger (p=0,05). Le pourcentage de **résistance 2aire était plus élevé chez les malades nés à l'étranger pour chaque antituberculeux** et la différence était statistiquement significative pour la streptomycine (26,7% vs 11,1%, p=0,04), et la rifampicine (21,7% vs 4,4%, p=0,01), et à la limite de la significativité pour l'isoniazide (23,3% vs 8,9%, p=0,052). **Treize des 14 cas de multirésistance secondaire concernaient des malades nés à l'étranger** dont 1 seul était séropositif pour le VIH.

Monorésistance à la rifampicine

Il y avait en 2009 2 cas de "mono-résistance" à RMP (résistance à RMP, sensibilité à INH), l'un 1aire et l'autre 2aire (**Tableau 23)**, tous 2 chez des patients co-infectés par le VIH. Le nombre de cas "mono-résistants" à RMP est resté stable depuis 2006 (3 cas, 1 primaire et 2 secondaire), 2007 (1 cas secondaire) et 2008 (4 cas secondaires) et tous concernaient des patients co-infectés par le VIH.

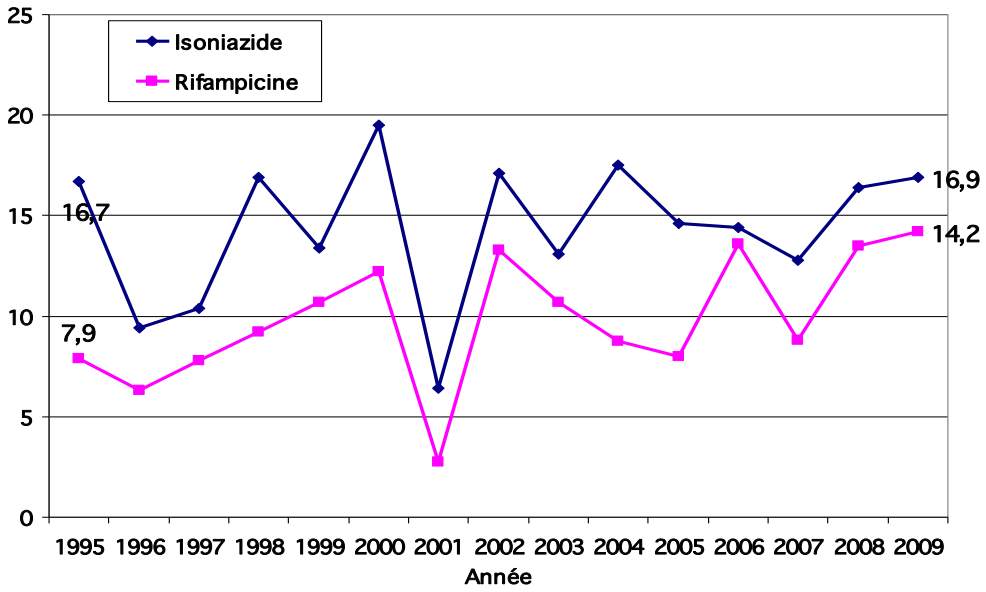


Figure 7 : Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2009

D.2.1.2. Surveillance exhaustive de la tuberculose à bacilles multirésistants à travers le réseau CNR-MyRMA

Au cours de l'année 2010, le CNR-MyRMA a recueilli, à travers son réseau de laboratoires correspondants pratiquant la mycobactériologie en France, des données concernant les cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2009. Comme chaque année, les données ne sont pas tout à fait complètes au moment de rédiger le rapport d'activité (81% de réponse au questionnaire). Les données colligées à ce jour concernent 4332 cas de tuberculose à culture positive.

La région Ile-de-France a diagnostiqué la moitié des cas documentés **de 2009 (15% à Paris) et la région Rhône-Alpes 13%. Chacune des autres régions représentent de 0,2 % (Corse) à 5% (Provence-Côte d'azur) du total des cas.**

Comme les années précédentes, un peu plus de la moitié des cas (52%) de tuberculose documentés en 2009 était concentrée dans les 25 laboratoires dont l'activité est la plus importante (Figure 8**):**

- 17 laboratoires de CHU d'Ile de France et 8 de province (dont 2 en Rhône-Alpes)
- 5 hôpitaux généraux d'Ile-de-France et 1 de Cayenne
- 3 gros laboratoires privés

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

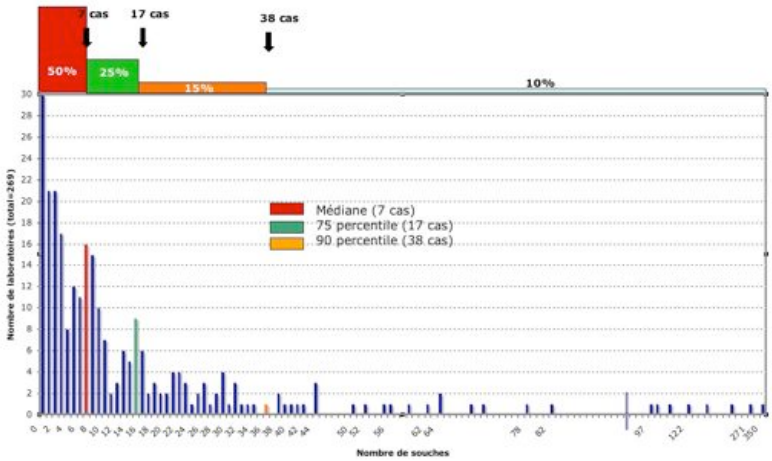


Figure 8 : Distribution des laboratoires du réseau du CNR-MyRMA en fonction du nombre de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2009

Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants

Le nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en France par les 230 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour était de 51 en 2009, ce qui représente une proportion de 1,2 ± 0,3% des 4332 cas colligés (**Tableau 24**). Parmi ces 51 cas MDR, 4 (7,8%) concernaient des patients déjà identifiés les années précédentes (cas à rechutes) et 47 des patients identifiés pour la 1ère fois en 2009. Le pourcentage de cas MDR calculé sur les 4332 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par l'ensemble des laboratoires français qui pratiquent la mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) est un peu, mais non significativement, inférieur à celui calculé sur les 1410 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les 37 laboratoires universitaires du réseau Azay-Mycobactéries (1,9 ± 0,4%, en cumulant les cas de résistance 1aire et 2aire). Cette tendance est explicable par le caractère spécialisé des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU.

Bien que les données 2009 de quelques laboratoires du réseau CNR-MyRMA, n'aient pas encore été rassemblées à ce jour malgré de nombreuses relances, il est peu probable que le nombre total de cas multirésistants diagnostiqués en France en 2009 augmente avec les réponses de ces derniers laboratoires car tous les cas correspondants aux souches MDR reçues par le CNR-MyRMA pour confirmation et antibiogramme complémentaire (cf. plus haut « activités d'expertise ») ont déjà été inclus dans l'analyse. La proportion définitive des cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2009 pourrait en revanche être très légèrement inférieure à 1,2% après intégration au dénominateur (total des cas de tuberculose à culture positive) des données des derniers laboratoires qui ne concerneront très probablement que des cas de tuberculose non MDR.
Calculée pour chacune des régions de France (**Tableau 24**), la proportion de cas multirésistants rapportée au total des cas de tuberculose bactériologiquement prouvés était en 2009 comprise entre 0 et 2%, sauf en Corse où on note 2 cas multirésistants pour seulement 11 cas au total, ce qui est lié à une petite épidémie de transmission croisée (cf § Détection de cas groupés).

Tableau 24 : Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2009 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA

Région	Total cas	Cas MDR	
		N	%
Alsace	67	1	1.5
Aquitaine	165	1	0.6
Auvergne	37	0	0
Bourgogne	59	0	0
Bretagne	143	3	2.1
Centre	76	0	0
Champagne Ardennes	29	0	0
Corse	11	2	(18)*
Franche-Comté	47	0	0
Ile de France	2126	30	1.4
Languedoc-Roussillon	63	0	0
Limousin	15	0	0
Lorraine	94	0	0
Midi-Pyrénées	100	1	1
Nord-Pas de Calais	175	1	0.6
Normandie Basse	58	0	0
Normandie Haute	58	0	0
Provence ACA	196	3	1.5
Pays de Loire	100	2	2
Picardie	52	0	0
Poitou-Charentes	46	1	2.2
Rhône-Alpes	560	6	1.1
Départements d'outre-mer	55	0	0
Total	**4332**	**51**	**1.2**

* dénominateur très petit

Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants

Les caractéristiques des 47 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2009 sont les suivantes :
- 66% sont des hommes
- 6 (13%) sont nés en France, et 41 (87%) à l'étranger
- parmi ceux nés à l'étranger, 15 sont nés en Afrique sub-saharienne, 4 au Maghreb, 13 en Europe de l'Est, et 9 en Asie,
- l'âge médian est 32 ans (15% de 15 à 24 ans et 45% de 25 à 34 ans),
- 9% sont séropositifs pour le VIH, 78% sont séronégatifs (13% de statut VIH inconnu)
- 81% des cas ont une tuberculose pulmonaire,
- 47% n'ont jamais été traités (MDR « primaire »),
- 60% des cas ont été diagnostiqués en Ile-de-France, dont 36 % à Paris, et 17 % dans la région Rhône-Alpes.

Tendances évolutives 1992-2009

Le pourcentage de cas multirésistants de 2009 est identique à celui de 2008 et un peu supérieur à celui de 2007 (0,9%) qui était une des deux années avec le plus faible pourcentage de cas de MDR depuis 2000. Durant les 17 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau 25), le pourcentage de cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en France est passé de 0,4-0,7% entre 1993 et 1998 à 0,9% en 1999-2001 et à 1,2 % environ depuis 2002. Cependant, le nombre absolu de cas MDR n'a jamais dépassé 80 par an**.**

Tableau 25 : Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2009)

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**	5381	**1,4**	[1,1-1,8]
2004	**68**	5331	**1,3**	[1,0-1,6]
2005	**65**	5352	**1,2**	[1,0-1,5]
2006	**60**	4933	**1,2**	[0,9-1,5]
2007	**44**	4708	**0,9**	[0,7-1,2]
2008	**57**	4887	**1,2**	[0,9-1,5]
2009*	**51***	4332	**1,2**	[0,9-1,5]

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

La distribution régionale des cas MDR identifiés par le CNR-MyRMA est restée remarquablement constante durant les années 2006-2009 **(**Tableau 26**), le nombre annuel de cas restant autour de 30 en Ile de France, de 5-6 en Rhône Alpes, de 2-4 en Provence-Côte d'azur et de 0 à 2 dans les autres régions.** Les cas MDR se répartissent d'une manière à peu près égale entre Paris, la région Ile de France en dehors de Paris, et les régions autres que la région Ile de France **(**Figure 9**).**

Tableau 26 : Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2006-2009 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA

Région	2006	2007	2008	2009	TOTAL
Alsace	2	0	2	1	5
Aquitaine	3	0	1	1	5
Auvergne	0	0	0	0	0
Bourgogne	0	0	0	0	0
Bretagne	1	1	2	3	7
Centre	0	0	1	0	1
Champagne Ardennes	1	0	0	0	1
Corse	0	0	3	2	5
Franche-Comté	0	0	0	0	0
Ile de France	35	28	31	30	124
Languedoc-Roussillon	0	1	2	0	3
Limousin	0	0	0	0	0
Lorraine	2	2	0	0	4
Midi-Pyrénées	0	1	0	1	2
Nord-Pas de Calais	2	1	1	1	5
Normandie Basse	0	1	0	0	1
Normandie Haute	2	3	0	0	5
Provence ACA	4	1	2	3	10
Pays de Loire	2	0	2	2	6
Picardie	0	0	1	0	1
Poitou-Charentes	1	0	1	1	3
Rhône-Alpes	3	5	7	6	21
Départements d'outre-mer	2	0	1	0	3
Total	**60**	**44**	**57**	**51**	**212**

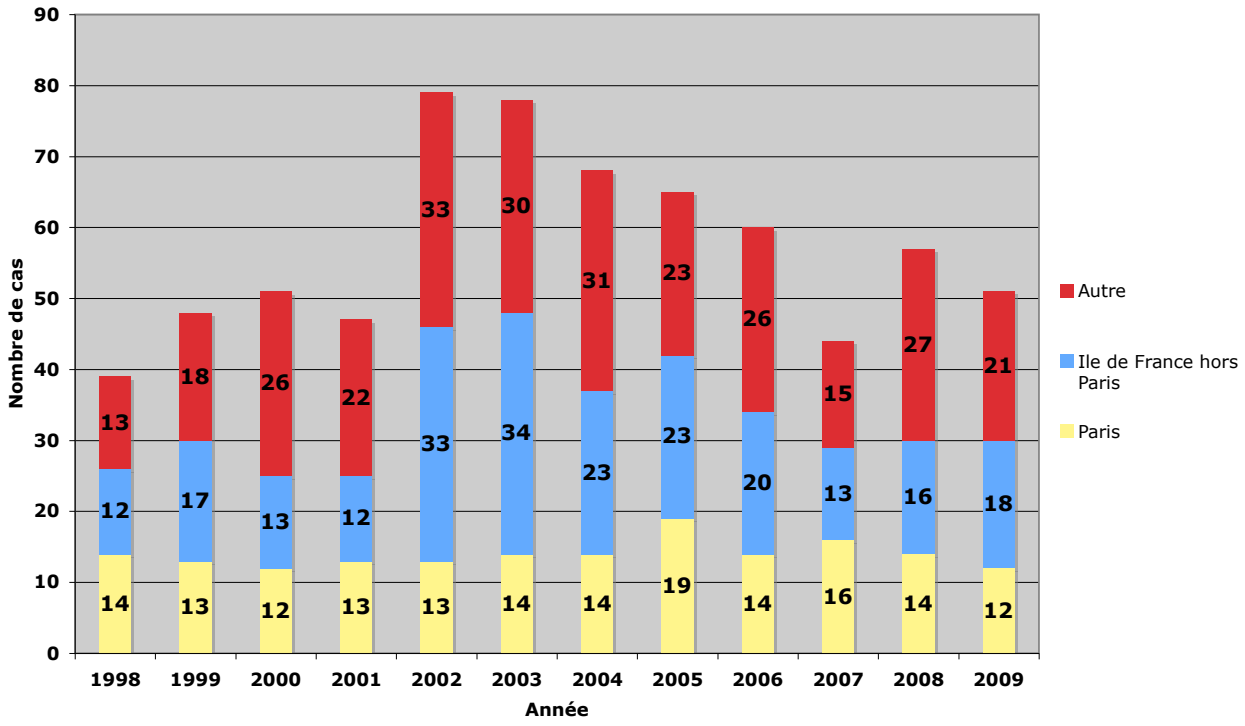


Figure 9 : Evolution de la distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants selon la région du laboratoire signalant le cas : Paris, Ile de France, autres régions, 1998-2009

Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont beaucoup modifiées durant les 17 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (**Tableau 27**). Il faut noter une **diminution** des proportions représentées par les **hommes** (74 à 60%), par **les patients avec antécédents de traitement** (72 à 31%**),** par les **patients séropositifs pour le VIH** (19 à 11%) et par les **patients nés en France** (48 à 15%). **L'augmentation de la proportion de patients nés à l'étranger (de 52 à 85%) concerne ceux nés en Europe (Europe de l'est et ex-URSS) et en Afrique sub-saharienne.**

D.2.1.3. Surveillance de la méningite tuberculeuse à travers le réseau CNR-MyRMA, tendances évolutives

Le CNR-MyRMA a réalisé tous les 5 ans depuis 1990 (1990, 1995 et 2000) une enquête sur la méningite tuberculeuse à culture positive tous âges confondus. Une nouvelle enquête a été menée rétrospectivement sur les cas diagnostiqués en 2006 et en 2007, au moment des modifications de l'obligation vaccinale en France. A ce jour, après élimination des doubles déclarations, **le CNR-MyRMA a recensé 40 cas de tuberculose méningée à culture positive en 2006 et 28 cas en 2007** (total 68 cas). Des informations ont pu être réunies pour 39 des 40 cas de 2006 et tous les cas de 2007.

L'analyse des caractéristiques des 68 cas montre que l'âge moyen est de 48 ans, 54% sont des femmes, que 50% des patients sont nés en France, et 10% sont séropositifs pour le VIH. Parmi les 7 séropositifs pour le VIH, 6 sont nés à l'étranger.
Parmi les 68 cas, **3 concernaient des enfants de moins de 5 ans : 2 en 2006 et 1 en 2007**. Ces 3 patient sont nés en France dont un dans un département d'outre mer et pour lequel de nombreuses informations sont manquantes. Les deux enfants de métropole ne semblent pas avoir été vaccinés par le BCG et ont été traités pendant un an au total.

Les données concernant les cas de 2007 ont été croisées avec celles concernant les 85 cas recensés par l'InVS cette même année dans le cadre de la notification obligatoire de la tuberculose pour permettre une analyse de capture-recapture, comme nous avion fait pour les cas de 2000. A ce jour, peu de cas communs ont été identifiés avec certitude en raison de l'anonymisation des données de la notification obligatoire au moment de la constitution du fichier de l'InVS.
L'accord de la CNIL a été obtenu en 2010 pour lever l'anonymat et retourner aux données nominatives disponibles au niveau des Agences régionales de Santé (ARS, ex-DDASS). Le long travail qui consiste à croiser une à une les fiches de notification obligatoire avec celles du CNR-MyRMA a commencé (cf. projet).

Parce que le nombre de cas de méningite tuberculeuse chez les enfants de 5 ans et moins constitue un des indicateurs proposés par l'International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) pour juger de la possibilité d'arrêt de la vaccination par le BCG, il a été décidé de recueillir cet indicateur chaque année depuis 2000. Pour cela, le CNR-MyRMA a entrepris une **enquête rétrospective concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants de ≤ 5 ans** à travers son réseau.

Le **Tableau 28** présente l'état actuel des données recueillies au CNR-MyRMA. Il **ne semble pas y avoir de tendance à la hausse du nombre de cas** (**0 à 3 cas par an)** mais quelques laboratoires n'ont pas encore confirmé l'absence de cas. Le recueil d'information auprès des cliniciens est en cours. Les données seront croisées avec celles disponibles à l'InVS et recueillies dans le cadre de la notification obligatoire.

Tableau 27 : Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 2006 à 2009

Caractéristiques	Période			
	1992-1995	**1996-2000**	**2001-2005**	**2006-2009**
N total de cas recensés, dont :	186	192	339	212
- déjà connus CNR-MyRMA	35 (19%)	38 (20%)	42 (12%)	17 (8%)
- recensés pour la 1ère fois	151 (81%)	154 (80%)	297 (87%)	195 (92%)
Parmi les cas signalés pour la 1ère fois :				
Age médian	39 (16-87)	37 (18-88)	31 (1-95)	33 (1-92)
Sexe masculin	74%	65%	61%	60%
Antécédents de traitement	72%	55%	39%	31%
Atteinte pulmonaire	92%	94%	90%	86%
Séropositif pour le VIH	19%	19%	17%	11%
Né à l'étranger, dont :	52%	62%	79%	85%
- Europe	3%	10%	13%	25%
- Maghreb	15%	17%	17%	10%
- Afrique sub-saharienne	20%	23%	35%	38%
- Autres	14%	12%	14%	12%
Examen microscopique +	56%	63%	62%	54%
Résistance à l'éthambutol	34%	30%	32%	44%
Résistance à la streptomycine	55%	56%	63%	72%

Tableau 28 : Nombre de cas de méningite à culture positive diagnostiqués chez des enfants de moins de 5 ans par les laboratoires du réseau CNR-MyRMA de 2000 à 2009

Année	N cas
2000	1
2001	0
2002	2
2003	0
2004	1
2005	1
2006	2
2007	1
2008	3
2009	1

D.2.2.Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens, de la tuberculose

Les données réunies par le réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance primaire et secondaire du bacille tuberculeux sont envoyées à l'ECDC et, par ce biais, à l'OMS grâce à la collaboration ECDC-OMS région Europe. Ces données sont intégrées aux rapports de l'OMS.
Depuis 2008, le CNR-MyRMA utilise en routine la technique MIRU-VNTR 24 loci pour le génotypage de *M.tuberculosis*. En 2009, nous avons donc pu intégrer le groupe de travail Européen MIRU-VNTR et participer à la mise en place du projet « Molecular surveillance of MDR/XDR-TB in Europe », conjointement coordonné par le European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) et le National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas). L'objectif du projet est d'établir une action concertée de surveillance moléculaire des souches MDR circulant en Europe basée sur la technique MIRU-VNTR, de définir les conditions de standardisation de la technique afin d'en augmenter la reproductibilité, et de créer une base de données permettant l'échange des résultats. Au total, 30 pays participent au projet. Dans le cadre de ce programme, le

CNR-MyRMA a également participé aux deux premiers contrôles de qualité européen de génotypage MIRU-VNTR (cf. supra).

D.2.3. Etude génotypique des souches de *M.tuberculosis* : détection et investigation des cas groupés

En 2010, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser, en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain, le génotypage (empreintes digitales génomiques) de **153** souches de *M.tuberculosis,* dont 45 souches MDR.

Le contexte épidémiologique des demandes de génotypage de *M.tuberculosis* complex peuvent être regroupés de la manière suivante :
suspicion de tuberculose nosocomiale ou de transmission dans des familles ou des collectivités, pour lesquelles le génotypage complète l'enquête épidémiologique « autour d'un cas » réalisée par les DDASS et les Services de lutte antituberculeuse (SLAT),
suspicion de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
suspicion de contamination de laboratoire,
étude systématique des souches des cas de tuberculose à bacilles multirésistants. Cette étude permet de participer au programme Euro-TB.

D.2.3.1. Complément bactériologique des enquêtes épidémiologiques « autour d'un cas »

En 2010, 70 souchesont été génotypées dans cette indication dont 2 analysées à la fois pour suspicion de transmission croisée dans un contexte familial et pour suspicion de contamination de laboratoire.

24 situations de suspicion de transmission en collectivité (55 cas) (**Tableau 29)** :

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas dans 16 situations et, au total, pour 38 des 55 cas. Les 16 situations comportaient chacune de 2 à 5 cas bactériologiquement reliés :
6 fois au sein de familles (5 fois 2 cas liés et 1 fois 2 cas reliés à 1 cas de 2008)*
1 fois au sein d'une école d'ingénieurs (4 cas liés)
3 fois au sein d'une entreprise (2 fois 2 cas liés et 1 fois 1 cas lié à 1 cas de 2008)
1 fois au sein d'un foyer de travailleurs migrants dans le Val-de-Marne (3 cas liés)
5 fois dans un contexte plus complexe : 3 fois 2 cas liés dans un contexte amical ; 1 fois 5 cas liés dans un contexte mixte familial et lycée; 1 fois 3 cas liés dans un contexte amical et de travail.

7 situations de suspicion de transmission nosocomiale (15 cas) (**Tableau 29)** :

Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas pour 4 situations (au total pour 9 des 15 cas) :
- 5 cas liés ont été identifiés chez des malades immunodéprimés (greffés pulmonaires / mucoviscidoses) d'un même service des Hospices Civils de Lyon. L'analyse des événements et la formulation d'hypothèses sur la transmission croisée de tuberculose dans le service s'est avérée délicate, notamment en raison de la microscopie négative et donc, a priori, de la très faible contagiosité des cas index supposés. L'enquête a permis d'identifier en fait 2 évènements distincts de transmission croisée : 1 cas était relié à 1 cas index (microscope négatif) d'une part, et 2 cas étaient reliés à un autre cas index (microscope négatif) d'autre part.
Devant le caractère exceptionnel de cette situation, nous avons décidé de confirmer ces résultats par la technique de référence RFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction), dont les conclusions furent les mêmes.
- 2 fois 2 cas liés ont été identifiés dans 2 autres hôpitaux (Fernand Widal à Paris, Cavaillon).

Tableau 29 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyrMA en 2010, classés selon le contexte épidémiologique

Contexte	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement
Maison de retraite	2	0
Entreprise	1	1 cas relié à 1 cas de 2008
Entreprise	2	2
Entreprise	2	2
Famille	2	2
Famille	2	2
Famille	2	2
Famille	1	0 (non relié à 1 cas de 2010)
Famille	2	2
Famille	2	0
Famille	2	2 (et reliés à 1 cas de 2008)
Famille	2	2
Famille	2	0
Lycée hôtelier + famille	5	5 cas (4 reliés même lycée, 1 relié dans famille d'un lycéen)
Ecole d'ingénieur	4	4
Foyer travailleurs migrants (V-de-Marne)	5	3
Foyer travailleurs migrants (Montreuil)	3	0
Foyer travailleurs migrants (Gennevilliers)	2	0 (non reliés à 1 cas de 2009)
Communautaire (amis, entreprise)	3	3
Communautaire (amis)	1	0 (non relié à un cas de 2009)
Communautaire (amis)	2	2
Communautaire (amis)	3	2 (1 cas non relié)
Communautaire (amis)	2	2
Malade-->soignant (Fernand Widal)	2	2
Malade-->soignant	2	0
Malade-->soignant	2	0
Malade-->malade (Lyon)	3	3
Malade-->malade (Lyon)	2	2
Malade-->malade (Cavaillon)	2	2
Malade-->malade	2	0
Total	**70**	**47**

Tendances évolutives 2006-2010

Comme le montre le **Tableau 30**, le CNR-MyRMA a identifié par génotypage de 2006 à 2010, en complément des enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT et CCLIN :
- 6 à 16 épisodes confirmés de cas groupés en collectivité par an, soit 57 épisodes en 5 ans totalisant 154 cas (2 à 10 cas par épisode).
- 1 à 5 épisodes confirmés de cas groupés en milieu de soins, soit 17 épisodes en 5 ans totalisant 42 cas (2 à 7 cas par épisode).

Tableau 30 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques en collectivité et en milieu de soin : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2010 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage).

	Collectivités et familles	**Milieu de soin**
2006	11 enquêtes (total : 28 cas suspects) 7 épisodes confirmés : total 17 cas, 2 à 4 cas/épisode	6 enquêtes (total : 23 cas suspects) 3 épisodes confirmés : total 6 cas, 2 cas/ épisode
2007	19 enquêtes (total : 50 cas suspects) 6 épisodes confirmés : total 23 cas, 2 à 5 cas/épisode	3 enquêtes (total : 9 cas suspects) 1 épisode confirmé : total 2 cas
2008	24 enquêtes (total : 65 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 45 cas, 2 à 10 cas/épisode	7 enquêtes (total : 21 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 13 cas, 2 à 7 cas/épisode
2009	12 enquêtes (total : 36 cas suspects) 12 épisodes confirmés : total 34 cas, 2 à 6 cas/épisode	6 enquêtes (total : 19 cas suspects) 5 épisodes confirmés : total 12 cas, 2 à 4 cas/épisode
2010	19 enquêtes (total : 44 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 35 cas, 2 à 5 cas/épisode	7 enquêtes (total 15 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 9 cas, 2 à 3 cas/épisode
Total	**85 enquêtes (223 cas suspects)** **57 épisodes confirmés :** **total 154 cas, 2 à 10 cas/épisode**	**29 enquêtes (87 cas suspects)** **17 épisodes confirmés :** **total 42 cas, 2 à 7 cas/épisode**

D.2.3.2. Suspicions de rechute

En 2010, le CNR-MyrMA n'a pas reçu de souche de patient suspect de rechute de tuberculose pour génotypage.

D.2.3.3. Suspicion de contamination de laboratoire

Nous avons reçu 40 souches (dont 2 souches déjà comptabilisées ci-dessus dans le cadre des enquêtes autour d'un cas) correspondant à 8 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. Pour 5 de ces 8 épisodes, le génotypage a confirmé la contamination de laboratoire (souches non distinguables). Ces 5 épisodes totalisaient 33 souches, par groupes de 2 souches (3 groupes), de 3 souches (1 groupe), de 5 souches (2 groupes) et 8 souches (1 groupe).

Tendances évolutives 2006-2010

Comme le montre le **Tableau 31**, le CNR-MyRMA a identifié par génotypage de 2006 à 2010 :
- 0 à 5 cas confirmés de rechute par an, soit 11 cas en 5 ans.
- 5 à 19 épisodes confirmés de contamination de laboratoire par an soit 53 épisodes en 5 ans, totalisant 152 cas (2 à 8 cas par épisodes).

Tableau 31 : 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 2010

	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
Total	**11 suspicions** **9 confirmations**	**77 enquêtes (total : 233 souches)** **53 épisodes confirmés :** **total 152 cas, 2 à 8 cas/épisode**

D.2.3.4. Souches multirésistantes

Nous avons en 2010 analysé l'ensemble des 45 souches MDR reçues en 2009 et 2010 par la technique du MIRU-VNTR 24 loci. L'analyse du « Minimum spanning tree » incluant l'ensemble des souches MDR analysées pour les deux années 2009-2010 (**Figure 10**) révèle l'existence de 10 clusters de souches partageant des codes MIRU 24 identiques. La majorité de ces clusters (n=6) sont rattachés à la lignée Beijing au sein du complexe clonal CC1 et représentent au total 18 souches (clusters B1 à B6, voir les détails ci-après). Les autres clusters sont rattachés aux lignées Ghana (CC3, 7 souches), « nt » (CC4, 4 souches), S (CC5, 2 souches), et LAM (2 clusters indépendants de 2 souches).

Clusters B1 à B6 rattachés à la lignée Beijing :
Cluster B1 : 5 souches différant par le génotype de résistance et sans lien épidémiologique apparent entre les patients. L'identité des codes MIRU est probablement liée à l'origine géographique commune des patients (Russie, Arménie, Géorgie et Tchétchénie).
Cluster B2 : 4 souches dont seules 2 sont reliées par l'enquête de terrain, et pour lesquelles le lien épidémiologique est évident (même famille, patients nés en Mongolie). La 3ème souche est indistinguable des 2 souches précédentes mais sans lien épidémiologique apparent. La 4ème souche diffère par le génotype et n'est pas épidémiologiquement reliée aux 3 autres. Les 4 patients sont originaires d'Asie (Chine, Tibet, Mongolie).
Cluster B3 : 3 souches, dont 2 correspondent à deux cas de résistance secondaire chez 2 patients sans lien épidémiologique apparent. La troisième souche a été isolée d'un patient sans lien épidémiologique apparent avec les deux premiers, mais l'absence d'antécédent de traitement suggère une résistance primaire, ce qui ne permet pas d'écarter définitivement une transmission à partir d'un des deux autres.
Cluster B4 : 2 souches différant par la sensibilité aux antibiotiques, sans lien épidémiologique apparent entre les deux patients
Cluster B5 : 2 souches partageant la présence d'une mutation peu fréquente impliquée dans un bas niveau de résistance à la rifampicine (L533P dans *rpoB*) et pour lesquelles le lien épidémiologique est clairement établi (même famille, patients nés au Viet-Nam).
Cluster B6 : 2 souches reliées épidémiologiquement (même famille, patients nés au Tibet).

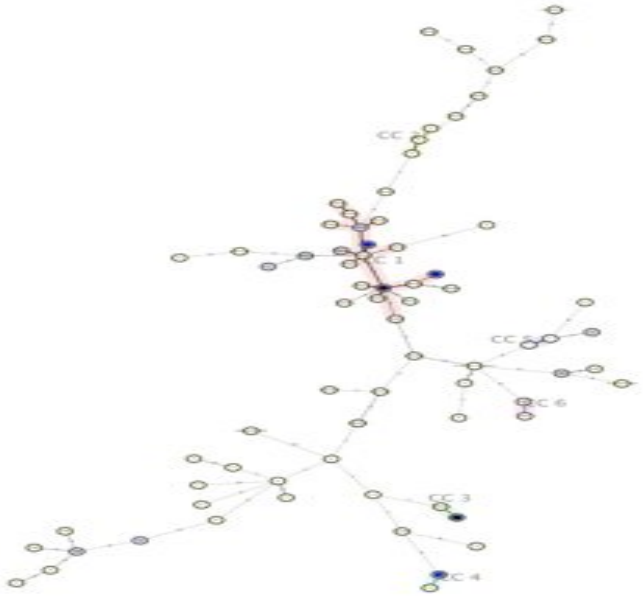


Figure 10 : Analyse du « Minimum spanning tree » (MST) incluant les 98 souches MDR reçues au CNR-MyRMA en 2009-2010. Les groupes de souches présentant des codes MIRU 24 identiques sont indiqués par des cercles de couleur au sein des complexes clonaux (CC)

Comme le montre **la figure 11**, les codes MIRU obtenus à partir de ces souches Beijing se regroupent dans un complexe clonal très homogène, ce qui traduit la difficulté de l'approche MIRU-VNTR à distinguer les souches génétiquement proches mais épidémiologiquement non reliées au sein de cette famille.

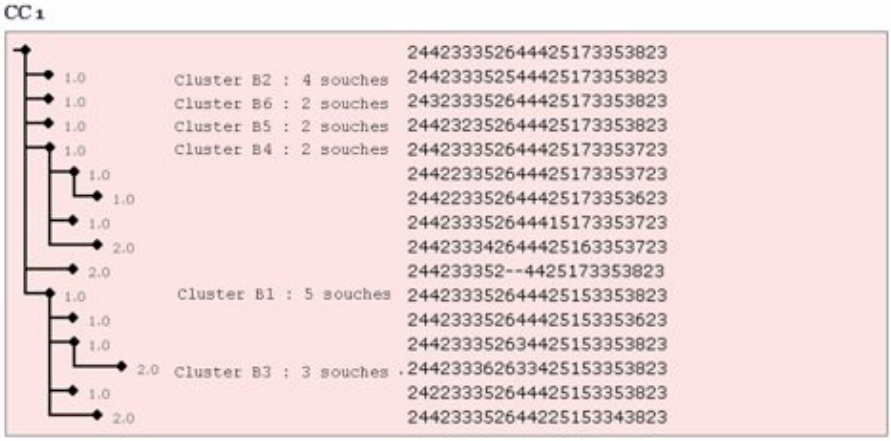


Figure 11 : Comparaison des codes MIRU 24 identifiés au sein du complexe clonal CC1 (lignée Beijing)

Cluster de souches rattachées à la lignée Ghana (CC3) : 1 groupe de 7 souches différant par le génotype de résistance et/ou différant par la sensibilité à un antibiotique, sans lien épidémiologique apparent entre les patients.

Cluster de souches « nt » (cf ci-dessous pour définition) non rattachées à une lignée définie (CC4) : 1 groupe de 4 souches isolées de patients sans lien épidémiologique apparent. On note un lien géographique pour 3 souches (Zaïre et Angola), ainsi que la présence dans 2 souches d'un SNP particulier dans le gène *katG* au niveau du codon 110 (A110V) qui pourrait traduire l'existence d'un clone spécifiquement associé à cette région de l'Afrique. Une souche très proche (1 MIRU de différence) provenait d'un patient d'une petite épidémie (en Corse) de 5 cas de 2008, 2009 et 2010.

Cluster de souches rattachées à la lignée S (CC5) : 1 groupe de 2 souches pour lequel l'enquête de terrain montre qu'il ne s'agit pas d'un cas de transmission

Clusters de souches rattachées à la lignée LAM (clusters indépendants non reliés à un CC) : deux groupes de 2 souches (L1 et L2) :
- Cluster L1 : 2 souches différant par le génotype de résistance et sans lien épidémiologique apparent. On note toutefois que les 2 patients sont originaires de Tchétchénie,
- Cluster L2 : 2 souches différant par le génotype de résistance, sans lien épidémiologique ou géographique apparent entre les deux patients.

La **répartition des lignées des souches MDR reçues en 2010 selon le pays de naissance des patients est illustrée au moyen d'une carte géographique (Figure 12, carte du bas)**. On voit la nette prédominance des souches appartenant à la lignée « Beijing » (n=14) si on considère les patients nés en Europe Centrale, Europe de l'Est et Asie (n=17), soit une proportion de 82%. Pour les patients nés en Afrique (n=15), on note par rapport aux précédents une plus grande diversité des lignées : S (n=1), Cameroun (n=2), Ghana (n=1), Haarlem (n=1), Beijing (n=1), ainsi qu'une proportion élevée de souches de forte variabilité génétique et n'appartenant à aucun des types MIRU décrits dans la base de données MIRU-VNTR (type « nt », n=9/15, soit une proportion de 60%). Concernant les patients originaires de France, les lignées sont diverses : Beijing (n=1), Ghana (n=1), S (n=1) et « nt » (n=1).

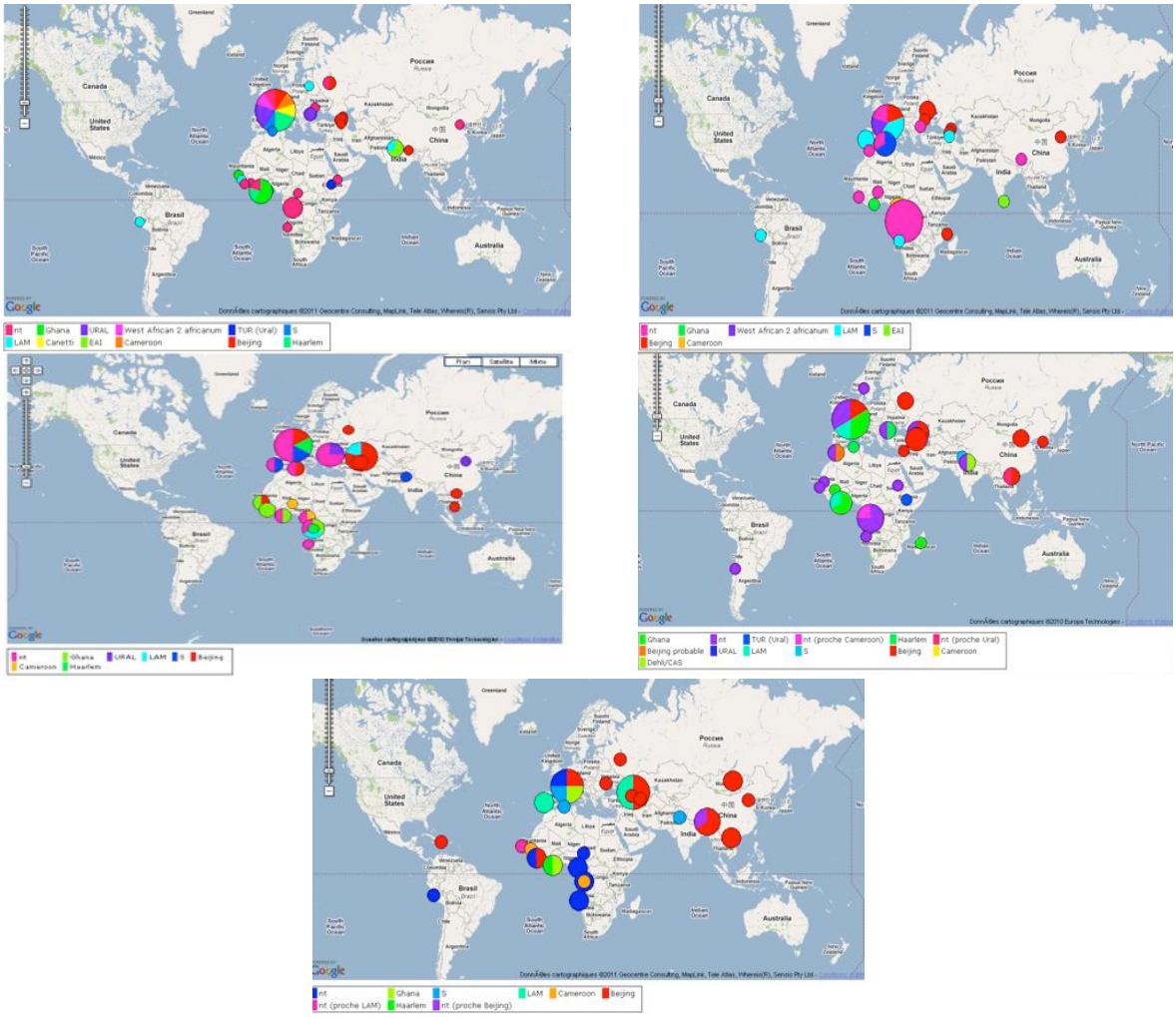


Figure 12 : Carte géographique montrant la répartition des souches MDR reçues au CNR-MyRMA selon le pays d'origine des patients. Pour chaque pays, le nombre de souches est proportionnel au diamètre du diagramme circulaire. La couleur indique la lignée (MIRU-24) à laquelle appartient chaque souche (ex. rouge : Beijing ; orange : Cameroon ; vert foncé : Ghana ; bleu clair : LAM).
De gauche à droite et de haut en bas : années 2006, 2007, 2008, 2009, 2010

Analyse des données 2006-2010 cumulées, tendances évolutives

La nette prédominance des souches appartenant à la lignée « Beijing » observée en 2010 (au total, 19 souches Beijing pour 45 souches MDR analysées, soit 42%), semble être liée à une augmentation constante depuis 2006 de la proportion annuelle des souches Beijing (**Tableau 32, Figure 13**), proportion qui était de 19% en 2006, 24% en 2007, 29% en 2008, 33% en 2009 et 42% en 2010.

Tableau 32 : Evolution de 2006 à 2010 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignées appartenant à la superfamille East African Indian, et en bleu à la superfamille Euro-American)

Lignée	2006	2007	2008	2009	2010	Total
Groupe PGG1						
EAI	2	1	0	0	0	**3**
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	**1**
Beijing	11	9	15	17	19	**71**
West African 2	1	1	0	0	0	**2**
Canettii	1	0	0	0	0	**1**
Groupe PGG2						
Haarlem	5	0	2	2	2	**11**
LAM	5	7	3	3	4	**22**
URAL	4	0	2	1	0	**7**
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	**2**
Cameroon	2	2	3	1	3	**11**
Ghana (T1)	4	1	5	6	2	**18**
T1-T2-T3	10	8	8	3	0	**29**
Divers						
S	2	2	3	1	3	**11**
nt	9	6	10	16	12	**53**
Total	**57**	**37**	**51**	**52**	**45**	**242**

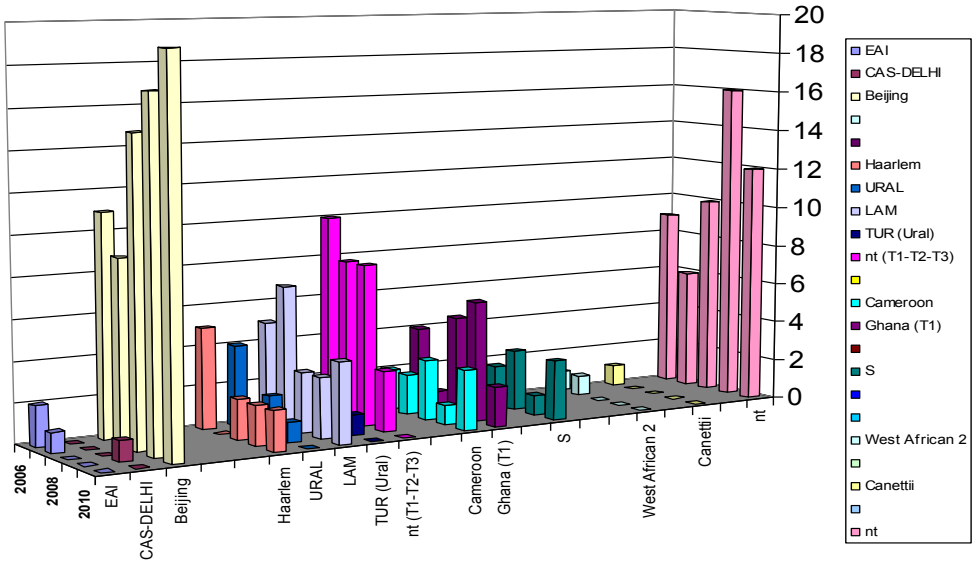


Figure 13 : Distribution des souches MDR reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2010 selon la lignée de rattachement des souches

Groupe PGG1

Superfamille East African Indian

Lignée Beijing :
Au total, pour la période 2006-2010, 71 souches MDR appartenant à la lignée Beijing ont été identifiées (soit 29% du nombre total des MDR). Pour la plupart, ces souches ont été isolées de patients originaires des pays de l'Europe Centrale, de l'Europe de l'Est et d'Asie : Géorgie (n=9), Tchétchénie (n=9), Arménie (n=6), Russie (n=5), Chine (n=4), Moldavie (n=3), Mongolie (n=2), Ukraine (n=2), Vietnam (n=2), Cambodge (n=1), Corée (n=1), Népal (n=1), Tibet (n=1) et Syrie (n=1). On note qu'une proportion significative (5/30, soit 16%) de souches Beijing est isolée chez les patients nés en France. Enfin, quelques cas uniques de patients infectés par des souches Beijing et ayant des origines diverses ont été identifiés (Algérie, Antilles, Congo, Comores, Ile de la Réunion, Sénégal).

Lignées CAS et EAI :
Les souches rattachées à ces deux lignées (n=4) sont minoritaires par rapport aux souches Beijing et correspondent à des patients nés en Inde et au Sri Lanka.

Lignées West African 2 et Canetti

La proportion globale des souches appartenant à ces deux lignées est faible (1%). Tous les cas détectés (n=3) correspondent à des patients nés en France.

Groupe PGG2

Superfamille Euroamerican

Cette famille de souches correspond à des lignées génétiquement hétérogènes et représente globalement 41% des souches MDR analysées pour la période 2006-2010.

Lignées Haarlem, LAM, URAL et TUR :
Les souches rattachées aux lignées Haarlem et LAM représentent 1/3 des souches appartenant à la superfamille Euroamerican (14% du total). Ces souches proviennent de patients d'origine géographique très diverses : France (n=6), Portugal (n=4), Tchétchénie (n=3), Côte d'Ivoire (n=3), Pérou (n=2) et des cas isolés en Arménie, Géorgie, Lituanie, Roumanie, Corée, Inde, Congo, Guinée-Bissao, République démocratique du Congo, Togo, Angola, Algérie et Tunisie.
Les souches URAL (n=7) sont majoritairement isolées de patients nés en Europe Centrale et de l'Est : Roumanie (n=3), Tchétchénie (n=2), ainsi que de France (n=2).
Les souches TUR (n=2) ont été isolées de patients originaires d'Ethiopie.

Lignées Cameroon, Ghana et T1-T2-T3 :
Les souches rattachées à ces lignées proviennent majoritairement de patients nés en Afrique. Elles représentent au total 58% des souches appartenant à la superfamille Euroamerican. Si on exclue de ce groupe les patients originaires de France (n=7), ces lignées sont clairement associées à des patients nés dans les pays suivants : République Démocratique du Congo (n=10), Côte d'Ivoire (n=9), Guinée (n=5), Congo (n=4), Sénégal (n=3), Angola (n=3), Cameroun (n=2), mais aussi Burkina Faso, Ghana, Mali, Niger, Maroc et Madagascar (n=1 par pays). On note 3 cas correspondant à des patients nés en Moldavie, Roumanie et Russie.

Autres lignées
Les souches appartenant à la lignée S sont décrites dans la littérature comme originaires de Sicile et de Sardaigne. Pour la période 2006-2010, nous avons identifié 11 souches S (4,5%) parmi les souches MDR. Elles ont été isolées de patients nés en Algérie (n=4), au Pakistan (n=3), en France (n=3) et au Portugal (n=1).

Pour finir, l'analyse MIRU-VNTR 24 loci n'a pas permis de rattacher 53 souches MDR (22%) de lignées connues. Ces souches, qui se caractérisent par une grande diversité génétique, se rapprochent de certaines lignées telles que Haarlem, LAM, Beijing, X1, X2, S, EAI, U, CAS-DELHI, mais présentent des codes MIRU-VNTR trop divergents pour être incluses dans ces groupes. On les regroupe sous le

sigle « nt » pour « non typable », terme adapté quand on prend la méthode MIRU-VNTR dans son objectif d'étude phylogénique (on ne peut rattacher la souche à une lignée ou « clade » connue) mais inexact si on prend la méthode MIRU-VNTR dans son objectif « empreintes digitales génomiques » pour les enquêtes sur la transmission croisée (on peut comparer entre elles les souches classées « nt »). Ces souches classées « nt » sont isolées majoritairement de patients nés en Afrique (n=25), principalement Congo et République Démocratique du Congo (n=9), Cameroun, Mauritanie, Centre Afrique, Côte d'Ivoire, Guinée, Cap-Vert, Sénégal, Angola, Tchad, Soudan, Djibouti, Algérie et Maroc, mais aussi de patients d'origines variées : France (n=4), Roumanie (n=5) et aussi Chine, Tchétchénie, Tibet, Inde, Vietnam, Chili, Pérou, Portugal et Norvège.

La **Figure 12** présente en **5 cartes géographiques l'évolution de la répartition des lignées des souches MDR reçues au CNR-MyRMA entre 2006 et 2010 selon le pays de naissance des patients**. Ces cartes résument bien l'évolution de la distribution des souches MDR isolées en France :
Les souches MDR provenant de patients nés dans les pays de l'Europe de l'est-Asie restent principalement rattachées aux lignées Beijing, LAM, URAL et Haarlem.
Les souches MDR provenant de patients nés en Afrique restent hétérogènes, avec une prédominance des lignées Cameroun, Ghana, S et une proportion importante de souches dont le rattachement à une lignée connue n'a pas pu être obtenu par MIRU-VNTR (souches hétérogènes « nt »).
Les souches MDR provenant de patients nés en France, en nette diminution en 2010 par rapport à 2006, restent rattachées à une grande diversité de lignées (Beijing, Cameroon, Ghana, Haarlem, LAM, S, URAL, West African 2, Canettii et « nt »).
Enfin, on note au cours du temps, et plus particulièrement en 2010, une forte progression du nombre de souches rattachées à la lignée Beijing chez celles qui sont isolées chez des patients nés en Europe Centrale-Europe de l'Est-Asie, ainsi que la présence de ce type de souche en Amérique du Sud et en Haïti.

Le **Tableau 33** résume les cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement parmi les 238 souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2010, identifiés grâce au génotypage systématique. **Nous avons identifié en 5 ans 8 groupes de cas MDR reliés, de 2 cas (n=6), 4 cas (n=1) ou 5 cas (n=1). Tous ces cas reliés étaient en rapport avec des environnements familiaux ou de milieu de travail « clos et étroit » (bar).**

Tableau 33 : Résultats du génotypage systématique des souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2010 : cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement

	N	Cas reliés* (contexte, pays de naissance)
2006	53	1 épisode de 2 cas (famille, Roumanie)
2007	38	1 épisode de 4 cas (famille + voisins, Portugal) 1 épisode de 2 cas (famille, Cameroun)
2008	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)**
2009	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Côte d'Ivoire)
2010	45	1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Tibet) 1 épisode de 2 cas (famille, Mongolie) 1 épisode de 2 cas (famille, Viet-nam)
Total	**238**	**6 groupes 2 cas, 1 groupe de 4 cas, 1 groupe de 5 cas**

* sur la base des empreintes digitales génomiques (méthodes : RFLP ou MIRU 24 loci, mutations conférant la résistance).
** en fait, 1 même épisode de 5 cas (famille et milieu de travail clos et étroit) étalés, sur 3 ans.

D.2.4. Alertes et enquêtes menées avec les autorités sanitaires

En 2010, le CNR MyRMA a participé avec les autorités sanitaires à 10 enquêtes ponctuelles, dont 8 sur des cas de tuberculose et 2 sur des cas d'infections à mycobactéries atypiques et à une étude rétrospective sur les infections à mycobactéries atypiques liée aux soins.
Les enquêtes ponctuelles sont décrites brièvement ci-dessous pour les cas de tuberculose et résumées avec la synthèse 2006-2010 pour les infections à mycobactéries atypiques.

Alertes et enquêtes 2010 sur des cas de tuberculose, bilan 2006-2010

Rapport 2010
- Epidémie de tuberculoses nosocomiales à bacilles sensibles en pneumologie survenue en 2009 et 2010 dans les hospices civils de Lyon : typage des souches confirmant la transmission à des patients greffés pulmonaires (cf. § génotypage) et participation aux conférences téléphoniques organisées par la DGS et le CCLIN Sud-Est.
- Alerte vers la DGS autour d'un cas MDR chez un adolescent scolarisé à Soissons et utilisant les bus scolaires. Deux conférences téléphoniques ont permis d'établir une stratégie de dépistage et de prise en charge des infections tuberculeuses latentes autour du cas index.
- Mise en place du dépistage et du traitement des cas contacts d'un cas de tuberculose XDR survenu à Nice, enquête / intervention avec la DGS. Le CNR, intervention pour faciliter la prise en charge du cas index et son rappariement dans son pays d'origine (Portugal).
- Stratégie de mise en place de dépistage chez les sujets contacts d'un cas de tuberculose à bacilles sensibles chez une auxiliaire de puériculture au CH de Chartes, avec la DGS.
- Réponse à une demande de l'InVS concernant la transmission de données de génotypage (MIRU-VNTR) aux autorités sanitaires britanniques concernant un cas MDR ayant circulé entre la France et la Grande-Bretagne.
- Réponse à une demande de la DGS concernant l'épidémiologie de la multirésistance en Seine-Saint-Denis en raison d'une crainte d'augmentation du nombre de cas. Les données fournies par les CNR-MyRMA pour les 10 dernières années ont montré qu'il n'y avait pas de modification significative de l'épidémiologie des MDR en Seine-Saint-Denis.
- Signalement à l'InVS en fin d'année 2010 concernant l'augmentation du nombre de cas de tuberculose XDR. Le seuil des 10% de cas XDR au sein des cas MDR avait été franchi pour la première fois (cf. § expertise).
- Bilan du nombre de cas de tuberculose due à *M.bovis* à la demande de l'InVS. Le CNR-MyRMA a, repris ses données des 7 dernières années qui ne montraient pas de modification significative du nombre de souches reçues. Ces données ont été publiées dans le BEH (numéro du 14 septembre 2010).

Bilan 2006-2010
Chaque année, le CNR-MyRMA participe à des alertes et enquêtes concernant la tuberculose avec les autorités sanitaires, mais le nombre de situations est passé de 1 à 2 par an de 2006 à 2009 à 8 en 2010.

Alertes et enquêtes 2010 sur des cas d'infection à mycobactérie atypique, bilan 2006-2010

Une étude rétrospective sur les infections à mycobactéries atypiques liées aux soins a été menée en 2010 avec les CCLIN et l'InVS pour la période 2001-2010, à partir des données du CNR-MyRMA (alertes, souches reçues, demandes d'expertise) et des signalements faits auprès des CCLIN. Les 54 cas documentés bactériologiquement ainsi répertoriés ont été regroupés dans le **Tableau 34** qui donne les espèces de mycobactéries en cause, le type de geste causal (chirurgical ou non chirurgical) et la finalité de ce geste (thérapeutique ou esthétique). Ces données sont en cours de publication.

Tableau 34 : Bilan retrospectif 2001-2010 des cas documentés d'infections à mycobactéries atypiques liées aux soins

Geste	Chirurgical	Non chirurgical
Thérapeutique	**12 cas** *4 M. xenopi, 1 M. intracellulare* *5 M. fortuitum, 1 M. goodii* *1 M. wolinskyi*	**5 cas** *3 M. chelonae, 2 M. avium*
Esthétique	**7 cas** *3 M. chelonae, 4 M. abscessus*	**40 cas** *40 M. chelonae, 2 M. frederiksbergense* (n.b. 2 cas d'infection à 2 espèces ≠)
Total	**19 cas**	**45 cas**

A partir des données ainsi réunies, nous avons dressé un bilan détaillé pour la mandature 2006-2010 des infections pour lesquelles nous avons apporté notre expertise bactériologique (travail sur les souches) et participé à des enquêtes ponctuelles (**Tableau 35**) :
- Les 2 cas survenus après des actes chirurgicaux à visée thérapeutique étaient des infections du site opératoire (prothèse ilio-fémorale, implant cochléaire) à *M.fortuitum* en 2006, et 2 cas d'infection à *M.xenopi* après arthroscopies en 2010.
- Les 3 cas survenus en 2008, 2009 et 2010 après des actes thérapeutiques non chirurgicaux étaient des infections à *M.chelonae* avec atteinte cutanée (3 cas) et osteo-articulaire (2 cas) chez des patients hémodialysés.
- Le cas de chirurgie dite esthétique de 2010 correspond à une infection cutanée à *M.fortuitum* sur prothèse mammaire.
- Les cas succédant à un geste esthétique sont des infections à *M.chelonae ou M.frederiksbergense* survenus dans un contexte de mésothérapie (2 épidémies, l'une en 2007 et l'autre en 2009), de cryothérapie (1 épidémie en 2008) ou de scléroses de varices (1 épidémie en 2010).

Tableau 35 : Bilan 2006-2010 des infections à mycobactéries atypiques liées aux soins connues du CNR-MyRMA (entre parenthèses : cas documentés microbiologiquement)

Cas d'infection	2006	2007	2008	2009	2010
cas liés à un geste chirurgical thérapeutique	2 (2)				2 (2)
cas liés à un geste thérapeutique non chirurgical			1 (1)	1 (1)	1 (1)
cas liés à un geste chirurgical esthétique					1 (1)
cas liés à un geste esthétique non chirurgical		16 (14)	8 (1)	7 (2)	1 (1)
Nb de cas totaux	**2 (2)**	**16 (14)**	**9 (2)**	**8 (3)**	**5 (5)**

Depuis 2007, des enquêtes environnementales ont été menée systématiquement par les CCLIN et le CNR-MyRMA dès l'alerte des premiers cas connus à travers le dispositif de signalement des infections liées aux soins, à la recherche de mycobactéries dans l'eau des sources potentielles proches des patients : chambre d'hospitalisation, cabinet médical, centre de soins, circuits de dialyse. Dans la majorité des cas, des mycobactéries atypiques de la même espèce que celles isolées chez le patient ont été isolées. Le CNR-MyRMA procède alors à une comparaison génomique soit par comparaison des séquences de gènes cibles utilisés pour l'identification moléculaire (*hsp65, rpoB*), soit par comparaison des profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé.
Pour une seule épidémie (cas d'infections à *M.chelonae* succédant à mésothérapie en 2007) une souche de profil identique à celle isolée chez les cas d'infections a été mise en évidence dans l'environnement (eau du cabinet médical).

Les investigations concernant cette épidémie ont été publiées :
- Carbonne A, *et al.*J Clin Microbiol. 2009 Jun;47(6):1961-4.
- Regnier S, *et al.* Clin Infect Dis 2009;49(9):1358-64

Parce que les alertes pour infections à mycobactéries atypiques liées aux soins ou gestes à visée esthétique sont maintenant fréquentes et que les recherches de mycobactéries dans l'eau sont de plus en plus souvent nécessaires, nous avons développé durant la mandature 2006-2010 des méthodes microbiologiques et moléculaires, qualitatives et quantitatives, de recherche des mycobactéries dans l'eau (cf. § Evaluations de nouvelles techniques).

D. 3. Conseil aux professionnels ou aux autorités de santé

D.3.1. Activités de conseil aux professionnels

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

Sur les 44 patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants identifiés en 2010, 39 ont fait l'objet de conseils thérapeutiques et de prise en charge par le CNR-MyRMA.
Parmi ces 39 patients, 22 ont fait l'objet d'une analyse approfondie du dossier médical et bactériologique au sein du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes» mis en place en 2003 par Nicolas Veziris, pneumologue et bactériologiste du CNR-MyRMA.
Neuf réunions ont été organisées en 2009.
Chaque réunion fait l'objet d'un compte-rendu écrit envoyé aux participants.
Un total de 64 dossiers ont été discutés durant ces réunions : 22 cas de tuberculose MDR de 2010, 1 dossier de sujet contact de cas de l'année 2009, 33 dossiers de tuberculose MDR des années précédentes (analyse de l'évolution sous traitement), 7 cas de tuberculose compliquée et 1 cas de mycobactériose.
Les dossiers staffés ont fait l'objet de 1 à 5 discussions différentes (médiane = 2).
Enfin, 17 autres nouveaux cas MDR de 2010, plus simples ou pris en charge par des équipes plus expérimentées ont fait l'objet de conseils thérapeutiques par relation directe entre Nicolas Veziris et les cliniciens en charge des malades.

Evolution 2006-2010
Nicolas Veziris, MCU-PH pneumologue et bactériologiste, a mis en place progressivement depuis 2003 un Groupe multidisciplinaire de conseil pour la prise en charge des tuberculoses à traitement difficile (MDR, intolérance médicamenteuse). En 2008, nous avons amélioré le fonctionnement de ce groupe appelé « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes». Nous avons élaboré le calendrier annuel des réunions afin de permettre aux membres de pouvoir y participer. Nous rédigeons depuis lors un relevé écrit de conseils thérapeutiques consensuels qui est envoyé aux cliniciens en charge des patients. Les réunions sont passées d'une fréquence bimestrielle à une fréquence mensuelle en 2009.

En 2010, les participants réguliers aux réunions du Groupe étaient :
- l'équipe du CNR-MyRMA,
- 2 praticiens du Centre Médical de Bligny (Mathilde Jachym, Nathalie Methivier),
- 1 pédiatre de l'hôpital trousseau (Katarina Chadelat),
- 1 pneumologue de l'hôpital Pitié-Salpêtrière (Bertrand Dautzenberg),
- 1 infectiologue de l'hôpital Bichat (Elisabeth Bouvet)
- 1 membre du CLAT 75 (Céline Duval ou Arthur Fournier)

L'activité du « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes» a régulièrement augmenté de 2006 à 2010 comme le montre le **Tableau 36**.

Tableau 36 : Activités de conseil assurées par le « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries difficiles à traiter » du CNR-MyrMA de 2004 à 2010

	N réunions de travail	N dossiers examinés	Types de dossiers
2006	5	11	- 2 cas XDR 2006 - 9 cas MDR 2006 (1 grossesse)
2007	5	13	- 2 cas XDR 2007 - 8 cas MDR 2007 (1 enfant 18 mois) - 3 prophylaxies contacts MDR
2008	6	44	- 22 cas MDR 2008 - 19 cas MDR 2007 (suivi) - 3 prophylaxies contacts MDR
2009	8	46	- 20 cas MDR 2009 - 18 cas MDR 2008 (suivi) - 8 prophylaxies contacts MDR
2010	9	64	- 22 cas MDR 2010 - 33 cas MDR 2008-09 (suivi) - 7 cas tuberculose non MDR compliquées - 1 prophylaxie contacts MDR - 1 mycobactériose

Appels téléphoniques et courriels pour conseils

Les appels téléphoniques et e-mails reçus au CNR-MyRMA pour demande de conseils ont été systématiquement comptabilisés sur support informatique à partir du 1er Juillet au 31 décembre 2010.
Durant cette période de 6 mois il y a eu 756 appels ou courriels d'une durée médiane de 5 minutes (extrêmes : 1-86 minutes).
Les motifs des demande de conseils sont listés ci-dessous (plusieurs motifs peuvent être abordés durant un même appel) :

Motif de la demande de conseil	N appels
Conseils techniques bactériologiques	56
Problèmes de diagnostic	90
Demande de commentaires sur les résultats	289
Traitement tuberculose MDR	162
Traitement tuberculose compliquée non MDR	102
Traitement mycobactériose	122
Total	**821***

* 821 motifs pour 756 appels

Rapporté aux nombres de jours ouvrables durant les 6 mois de recueil, cela représente une moyenne de 8 appels par jour.
La durée totale de ces appels et ou des réponses aux mails a été de 4602 minutes soit 77 heures. Extrapolée sur l'année cette durée représente **un mois d'équivalent temps plein de médecin**

D.3.2. Formation

Accueil de stagiaires

En 2010, le CNR-MyRMA a accueilli les stagiaires suivants :

- deux stages de 5 jours de techniciennes du CHU de Nice pour formation à la mycobactériologie avant

reprise d'activité du laboratoire L3 : Nathalie Debonnet et Alice Blombou.
- un stage de 5 jours d'une biologiste du CHU de Nice pour formation à la mycobactériologie avant reprise d'activité du laboratoire L3 : Alice Gaudard
- un stage de 5 jours de techniciennes de l'Institut Mutualiste Montsouris pour formation à la mycobactériologie avant ouverture du laboratoire L3
- un stage de 6 mois de Master 2 (Paris 6) : Alix Pantel. "Etude de l'impact des mutations de la sous-unité B de l'ADN gyrase de *Mycobacterium tuberculosis* sur la sensibilité aux quinolones" Master 2IMVI, Microbiologie parcours Bactériologie Moléculaire et Médicale, Paris V-VI-VII. 2010
- un stage de 6 mois de Master 2 (Paris 11) : Isabelle Lerat. "Bases du traitement des infections à *Mycobacterium abscessus* : étude expérimentale chez la souris" Master 2, Médicaments et autres produits de santé, spécialité dynamique cellulaire, microbiologie et biotechnologie, Parcours recherche « écologie microbienne, Pathogénie des microorganismes et Anti-infectieux »
- un stage de 6 mois de Master 2 (Paris 6) : Arnaud MAUDRY. "Mécanismes moléculaires de Résistance de *Mycobacterium tuberculosis* au pyrazinamide" Master BMC, Microbiologie parcours Bactériologie Moléculaire et Médicale, Paris VI. 2010
- un stage de 10 semaines de Master M1 (Paris 6) : Sabrina Dermouche "Etude de l'implication des mutations de l'ADN gyrase de *Mycobacterium tuberculosis* dans l'affinité pour les quinolones" Master 1 de Sciences et Technologies,Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire, Paris 6, 2010

Bilan 2006-2010

Le **Tableau 37** présente la synthèse des stages de formation organisé au CNR-MyRMA pour la mandature 2006-2010, soit au total 35 stagiaires pour une durée cumulée de 125 mois (moyenne annuelle de 7 stagiaires pour une durée de 25 mois).

Tableau 37 : Stagiaires (biologistes ou techniciens, français ou étrangers) reçus de 2006 à 2010 au CNR-MyRMA

	N stagiaires	Total mois de stage
2006	7	25
2007	3	24
2008	4	21
2009	13	35
2010	8	20
Total	**35**	**125**

Guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Le CNR-MyRMA a actualisé en 2010 le chapitre « Mycobactéries » du livre « l'antibiogramme » (ESKA publishing).

Enseignement sur les mycobactéries et la tuberculose

Master M1 Santé «Microbiologie Médicale et Moléculaire », Universités Paris 6 et Paris 7
Master M1 « Santé Internationale et Pathologie Tropicale », Paris 6
Master M1 mention « Sciences technologie santé », UE Immunologie, Paris 12
Master M2 « Médicaments et autres produits de santé, écologie microbienne pathogénie des microorganismes et anti-infectieux », Paris 11
Master M2 « Microbiologie », Paris 6
DU Antibiotiques et Antibiothérapie, Université Paris 7
DIU Dermatologie infectieuse et tropicale, Université Paris 6,
DIU Antibiologie, Université Tours-Poitiers
DIU Antibiologie, Université Nice Sophia-Antipolis
DIU Stratégie thérapeutique en Pathologie Infectieuse, Université Paris 5 et 7
DIU Chimiothérapie des infections nosocomiales, Université Paris 11 et 12
DIU médecine tropicale – santé internationale
DIU Pathologies Infectieuses de la femme enceinte, du fœtus et du nouveau né, Université Paris 11
DIU « tuberculose », Université Pierre et Marie Curie, Université Libre de Strasbourg
DES Biologie Médicale, Université de Paris
DESC Maladies Infectieuses et Tropicales

D.3.3. Information

De 2006 à 2010, le site internet **http://cnrmyctb.free.fr** a été régulièrement mis à jour pour :
- la fiche d'information à fournir au CNR-MyRMA en cas de demande d'expertise bactériologique (identification, tests de sensibilité aux antibiotiques, génotypage…),
- les fiches des enquêtes annuelles sur la tuberculose multirésistante et la méningite tuberculeuse qui peuvent être soit remplies directement en ligne sur le site soit imprimées puis remplies manuellement et envoyées,
- les résultats annuels de la surveillance de la tuberculose multirésistante et de la résistance primaire et secondaire,
- les nouvelles publications du CNR-MyRMA,
- la mise en ligne des rapports d'activité du CNR-MyRMA,
- la mise en ligne des diapositives des formations organisées ou co-organisées par le CNR-MyRMA.

D.3.4. Activités d'expertises auprès des autorités sanitaires nationales et européennes

Autorités sanitaires nationales

- Vincent Jarlier, Emmanuelle Cambau et Nicolas Veziris ont participé en 2008, 2009 et 2010 aux travaux de plusieurs groupes de travail du plan national Tuberculose du Ministère de la santé : (a) Tuberculose et tests de détection de l'interféron gamma, (b) Enquête autour d'un cas de tuberculose, (c) Recommandations de dépistage et de prise en charge des Infections Tuberculeuses Latentes.

- Vincent Jarlier, Emmanuelle Cambau ont participé en 2009 et 2010 aux réunions de travail du Ministère de la santé pour la révision de l'Arrêté de juillet 2007 sur les laboratoires de sécurité L3.

- Nicolas Veziris a participé en 2008 à la rédaction des recommandations « Prise en charge des abcès BCG » d e l'AFSSAPS

Autorités sanitaires internationales

- Vincent Jarlier, Emmanuelle Cambau ont participé au travail du réseau de laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) créé sous l'égide de l'ECDC : 1ère workshop janvier 2010 à Stockholm, rédaction de chapitres d'un manuel de techniques « Tuberculosis handbook » qui sera publié par l'ECDC en 2011.

- Jérôme Robert a Co-organisé avec le Dr A. Trébucq (UICT) du 2ème « Atelier sur la Prévention de la Tuberculose Nosocomiale », à Cotonou, Bénin du 6 au 8 juillet 2010, sous l'égide de l'Union Internationale de Lutte contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires (UICT), financé par USAID, AFD et UICT, en partenariat avec le KNCV et soutenu par l'OMS (5 pays participants : Bénin, Burkina Faso, Cameroun, République de Côte d'Ivoire, Togo)

- Emmanuelle Cambau a participé à la mise en place du réseau OMS « Surveillance de la résistance dans la lèpre » (Viet-Nam, octobre 2008) et a co-organisé le workshop de la 2ème année de ce réseau (Paris, novembre 2009), et contribué au rapport de la 2eme année de surveillance (réunion annuelle en novembre 2010 à Tokyo).

- Wladimir Sougakoff a participé à la mise en place du groupe de travail « Molecular surveillance of MDR/XDR-TB in Europe » organisé par le European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) et le National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), dont l'objectif est d'établir un programme de surveillance moléculaire des souches MDR circulant en Europe par la technique MIRU-VNTR (1er meeting 23-24 avril 2009 et 2ème meeting 28-30 septembre 2010, Bilthoven, Pays-Bas).

D.4. Travaux de recherche en lien avec l'activité du CNR-MyRMA (synthèse 2006-2010)

D.4.1. Chimiothérapie expérimentale des infections à mycobactéries

Tuberculose

Evaluation de nouveaux antituberculeux

Les **diarylquinolines** constituent une nouvelle classe d'antituberculeux. Le développement du TMC207, composé le plus étudié car le plus actif, a été mené dès le début en collaboration avec l'équipe du CNR-MyRMA. Durant les années 2006-2010 nous avons démontré :

1. que son activité bactéricide ne se manifeste que tardivement, après 2 semaines, ce qui peut expliquer sa faible activité dans l'étude d'Early Bactericidal Activity (EBA) conduite chez l'homme
2. qu'il a une activité stérilisante et que, combiné aux antituberculeux de première ligne, il permet d'envisager la réduction de la durée du traitement de 6 à 4 mois
3. qu'il permet de diviser par deux la durée du traitement quand il est combiné aux antituberculeux de seconde ligne utilisés pour le traitement des tuberculoses MDR
4. que du fait de sa longue demi-vie il permet d'envisager un traitement hebdomadaire de la tuberculose ce qui permettrait de rendre effective la supervision du traitement (Directly Observed Therapy recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé).

Nous avons également étudié un vivo l'intérêt des **molécules « boostant » l'activation de l'éthionamide** (l'éthionamide est une « prodrogue » inactive, activée in vivo par des enzymes des mycobactéries) développés par l'équipe d'Alain Baulard de l'institut Pasteur de Lille. Nous avons confirmé l'existence d'un effet booster in vivo permettant de réduire la posologie d''éthionamide pour une activité bactéricide équivalente.

Evaluation de l'intérêt de molécules existantes pour le traitement des tuberculoses MDR et XDR

Nous avons évalué l'association de différentes molécules déjà commercialisées, associations ne contenant ni rifampicine ni isoniazide, afin d'améliorer le traitement de la tuberculose MDR ou XDR.
Nous avons démontré que :

1. l'association amikacine + moxifloxacine + éthionamide + pyrazinamide permet de stériliser les souris en 12 mois. Ce résultat permet d'envisager la réduction de la durée du traitement des tuberculoses MDR pour les cas les plus simples pouvant bénéficier de ces quatre antibiotiques
2. la moxifloxacine conserve une activité sur certains mutants résistants aux fluoroquinolones et que la décision de l'utiliser malgré un résultat phénotypique « Résistant » peut être prise sur la base du résultat de l'analyse moléculaire des gènes *gyrA* et *gyrB*. Pratiquement, nous proposons, dans le cas de tuberculoses XDR, de ne pas l'utiliser pour les souches présentant une mutation en position 94 du gène *gyrA* mais de l'utiliser pour les souches présentant une mutation en position 90 du gène *gyrA* et en position 500 du gène *gyrB*.
3. l'association imipenème ou méropénème + acide clavulanique permet d'améliorer la survie la survie de souris infectées par *M.tuberculosis* sans toutefois avoir d'activité bactéricide. Ces résultats apportent un argument supplémentaire pour proposer ces associations en dernier recours pour des cas de tuberculoses XDR « désespérées ».

Ulcère de Buruli

Durant les années 2006-2010 nous avons poursuivi nos études de chimiothérapie expérimentale dans le but de mettre au point le traitement le plus efficace et le plus simple possible de l'ulcère de Burulli.
Nous avons démontré que :

1. la combinaison rifampicine-clarithromycine négative la culture des pattes de souris infectées après 4 ou 8 semaines de traitement ce qui suggère que ce traitement pourrait constituer une alternative orale intéressante au traitement de référence (rifampicine-streptomycine)
2. un traitement de 8 semaines par moxifloxacine-clarithromycine est équivalent aux traitements par rifampicine-streptomycine ou rifampicine-moxifloxacine tant en termes de comptes bactériens que de proportion de souris à culture positive. La combinaison moxifloxacine-clarithomycine pourrait donc être employée chez les patients qui ne peuvent pas recevoir de rifampicine

3. un traitement intermittent comprenant de la rifapentine administré 2 jours sur 7 est aussi efficace qu'un traitement comportant de la rifampicine administré 5 jours sur 7
4. le rythme 5/7 (« jours de semaine ») d'administration de rifampicine-streptomycine est moins stérilisant que le rythme 7/7 (« tous les jours y compris le week-end »)
5. un nouvel inhibiteur de la DHFR a une activité bactéricide (diminution de l'inoculum bacillaire de 2 log environ).

Mycobactéries à croissance rapide

Devant les mauvais résultats des traitements antibiotiques dans les infections à mycobactéries à croissance rapide (*M.abscessus*, *M.chelonae….*) nous avons décidé de mettre au point des modèles murins de ces mycobactérioses afin de pouvoir évaluer l'activité in vivo des antibiotiques et de lerus associations.
Un tel modèle a été mis au point pour *M.abscessus*. Dans ce modèle nous avons montré que la clarithromycine n'est pas active, en cohérence avec la présence naturelle d'un gène de résistance *erm* dans cette espèce, et que l'amikacine a une très faible activité bactéricide. L'activité d'autres molécules est en cours d'étude.

Lèpre

Nous avons démontré qu'une dose unique de la diarylquinoline TMC207 a une activité équivalente à celle des molécules de référence : rifapentine, rifampicine et moxifloxacine et est plus active que la minocycline, le PA-824 et le linézolide.

D.4.2. Mécanismes de résistance chez les mycobactéries

Mécanismes de résistance acquise au pyrazinamide (PZA) chez *M.tuberculosis*

L'objectif à terme est la mise au point d'un test génotypique permettant de prédire la sensibilité au PZA, qui serait particulièrement utile en raison des grandes difficultés techniques des tests phénotypiques (nécessité » de tester le PZA à pH acide ce qui gène beaucoup la croissance bactérienne).
Le pyrazinamide est une pro-drogue transformée par l'activité pyrazinamidase de la protéine PncA de *M.tuberculosis*. La résistance au pyrazinamide chez *M.tuberculosis* est principalement liée à l'acquisition de mutations au sein du gène *pncA* qui code pour la pyrazinamidase. En 2006-2009, nous avons mené à terme la détermination de la structure 3D de la pyrazinamidase de *M.tuberculosis*. L'obtention de cette structure représente une avancée majeure pour interpréter des tests génotypiques destinés à prédire la résistance au pyrazinamide. Toutefois, on observe que les mutations identifiées dans PncA présentent une très grande diversité du point de vue de la nature des substitutions et du positionnement des mutations sur la protéine (cf tableau des mutations PncA plus loin). Cette diversité rend difficile l'interprétation de l'effet des mutations à partir de la modélisation 3D de la pyrazinamidase. C'est pourquoi il était nécessaire de compléter l'analyse structurale par des mesures biochimiques visant à déterminer l'effet des mutations sur l'activité enzymatique de la pyrazinamidase.
En 2010, nous avons entrepris ces études en utilisant une approche in vitro basée sur la mutagenèse dirigée qui nous permet de reproduire les mutants PncA observés à partir des souches cliniques. Ces mutants ont été analysés afin de mesurer pour chacun d'entre eux (1) les constantes cinétiques (k_{cat} et K_m) de l'activité pyrazinamidase et (2) la stabilité de repliement de la protéine PncA par la technique dite du « Thermal Shift Assay » décrite par E. Loisel et coll. (*J. Mol. Biol. 2008 381, 594–606*). Les résultats obtenus montrent qu'on peut distinguer deux grands groupes de mutations.

Le premier groupe, détaillé sur la **Figure 14A**, comprend des mutations qui affectent soit la machinerie catalytique de l'enzyme (acides aminés D8, K96 et C138), soit la poche de fixation d'un ion Fe2+ important pour le repliement de PncA (acides aminés D49, H51, H57), soit la stabilité globale de la protéine et la liaison du substrat (acides aminés A134 et W68). Les mutations identifiées au niveau de ces résidus à partir des isolats cliniques sont clairement associées à la perte d'activité pyrazinamidase de PncA et, par conséquent, à la résistance au PZA.

Le deuxième groupe de mutations, détaillé sur la **Figure 14B**, regroupe des changements d'acides aminés plus difficiles à interpréter. Ces modifications sont le plus souvent éloignées du site de liaison

du PZA et se caractérisent par un effet significatif sur l'activité pyrazinamidase (acides aminés représentés en rouge sur la **Figure 14B**) ou, au contraire, par une absence d'effet sur cette activité (acides aminés représentés en vert sur la **Figure 14B**). Des études complémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre l'absence d'effet lié à ces mutations, et améliorer notre capacité à prédire la sensibilité au PZA à partir des tests génotypiques.

Ces résultats ont été soumis fin 2010 et publiés début 2011 : Petrella S, *et al.* PLoS One. 2011 Jan 24;6(1):e15785

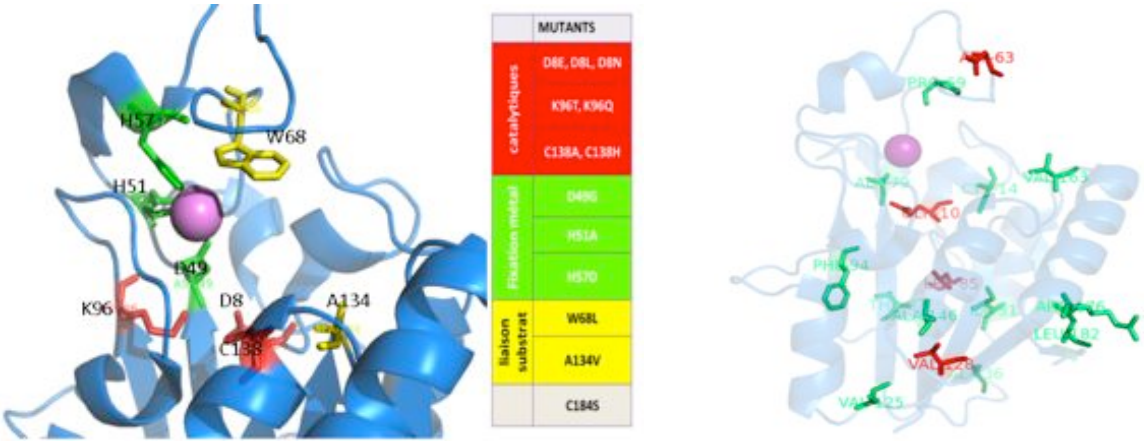


Figure 14 : Modèle 3D de la pyrazinamidase de *M.tuberculosis*. <u>Gauche</u> (A) : région du site de liaison du pyrazinamide dans PncA, montrant des mutations qui affectent le mécanisme catalytique (en rouge), la liaison d'un ion Fe^{2+} important pour stabiliser la protéine (en vert, Fe^{2+} étant représenté par une sphère violette), et la liaison du substrat (en jaune). <u>Droite</u> (B) : vue globale de la protéine montrant des mutations éloignées du site de liaison du PZA

Mécanismes de résistance acquise aux diarylquinolines chez *M. tuberculosis*

L'objectif est d'anticiper et analyser les mécanismes moléculaires de résistance acquise au R207910, antituberculeux appartenant à une nouvelle famille d'antibiotiques, les diarylquinolines (DARQ). Cet antibiotique cible l'ATP synthase mycobactérienne qui est une enzyme clé du métabolisme énergétique, comme nous l'avons montré il y a plusieurs années (Andries Science 2005). La DARQ R207910 est très actif *in vitro* et *in vivo* sur les mycobactéries.
Les études que nous avons menées sur l'ATP synthase depuis quelques années (Andries Science 2005) suggèrent que le R207910 se fixe à l'ATP synthase au niveau d'une sous-unité transmembranaire (sous-unité C) qui forme une structure en forme d'anneau dans la membrane, et qui est impliquée dans un transfert de proton essentiel au fonctionnement de l'enzyme. La modélisation 3D de l'anneau C de l'ATP-synthase de *M.tuberculosis* nous a permis de faire l'hypothèse que la zone d'interaction du R207910 avec la sous-unité C est localisée au niveau du site de transport du proton qui correspond à l'acide aminé Glu61(c) et aux résidus avoisinant occupant les positions 32, 59, 63 et 66. Fait intéressant, nous avons pu sélectionner in vitro et à partir de différentes espèces de mycobactéries des mutants résistants au R207910. Environ 50% de ces mutants portent des mutations au niveau de ces positions, ce qui confirme que le R207910 se fixe sur la sous-unité C (*Petrella Antimicrob Agents Chemother. 2006 Aug;50(8):2853-6*). Cependant, l'obtention fréquente de mutants ne portant pas de mutations sur la sous-unité C, et plus généralement sur l'ensemble des sous-unités de l'ATP synthase, indique qu'il doit également exister d'autres mécanismes pouvant intervenir dans la résistance au R207910.
En 2010, nous avons cherché à identifier ces autres mécanismes de résistance acquise au R207910 à partir de clones de mycobactéries capables de pousser sur des concentrations élevées de l'antibiotique mais ne présentant pas de mutations au niveau des différentes sous-unités de l'ATP synthase. La stratégie de l'étude a été définie à partir des travaux publiés sur le mécanisme d'action du N,N'-dycyclohexylcarbodiimide (DCCD) qui est, à l'instar du R207910, un inhibiteur d'ATP synthase se fixant au niveau du résidu Glu61 de la sous-unité C. Une étude réalisée sur l'inhibition de l'ATP synthase de *Methanothermobacter thermautotrophicus* par le DCCD révèle qu'il existe des clones résistants au

DCCD dont les gènes codant pour l'ATP synthase ne sont pas mutés, mais qui se caractérisent par une augmentation marquée du niveau de production de l'ATP synthase. Chez les mycobactéries, il a été montré en 2009 que certains antibiotiques comme l'amoxicilline étaient capables d'induire une augmentation du niveau de production de l'ATP synthase chez *M.tuberculosis*. Sur la base de ces résultats, nous avons entrepris des travaux visant à montrer que la résistance au R207910 chez les mycobactéries pourrait être liée à un mécanisme similaire. Dans un premier temps, nous avons choisi *M.abscessus* comme modèle d'étude en raison (i) de son caractère peu pathogène et (ii) de la présence d'une région de régulation pouvant potentiellement contrôler le niveau de synthèse de l'ATP synthase et (iii) de sa croissance rapide. Nous avons mis au point un protocole permettant de doser par Real-Time RT-PCR la quantité d'ARN messager produit à partir du gène de la sous-unité C de l'ATP synthase (le niveau d'ARNm produit dans la cellule est directement proportionnel au niveau de production de l'enzyme).
Les résultats préliminaires obtenus suggèrent qu'une quantité plus importante d'ARN messager est produite chez les souches résistantes capables de croître en présence de TMC207, par rapport à celle mesurée à partir d'une souche sensible. Ces résultats, s'ils sont confirmés chez *M.tuberculosis*, ouvrent un nouveau champ d'étude sur le rôle joué par la régulation du métabolisme respiratoire dans l'inhibition de la croissance des mycobactéries.

En parallèle à ces études, nous avons poursuivit la caractérisation structurale de l'ATP synthase mycobactérienne. Après plusieurs tentatives infructueuses de surproduction de la sous-unité C chez *Escherichia coli*, nous avons réorienté nos travaux vers la purification de l'ATP synthase complète à partir de *Mycobacterium smegmatis*, mycobactérie "modèle" non pathogène. A l'heure actuelle, nous avons pu développer un protocole permettant la purification du domaine cytosoluble de l'ATP synthase et avons commencé sa caractérisation structurale par microscopie électronique.

Mécanismes de résistance acquise à l'isoniazide chez *M.tuberculosis*

L'isoniazide est une pro-drogue activée par une enzyme à hème, la catalase-peroxydase KatG, et qui cible la protéine InhA impliquée dans la synthèse des acides mycoliques de la paroi mycobactérienne. La résistance à l'isoniazide est principalement liée à 3 mutations qui affectent (i) l'enzyme KatG (mutation S315T), (ii) l'enzyme InhA (S94A) et (iii) le promoteur qui contrôle le niveau de synthèse d'InhA (mutation -15c->t). Dans le cadre de l'identification en routine de ces 3 mutations pour recherche de résistance à l'INH, nous avons identifié une dizaine de nouvelles mutations dans KatG pour lesquelles le rôle dans l'activité de l'enzyme et dans la résistance à l'INH n'a jamais été caractérisé. Nous avons entrepris une étude biochimique et structurale visant à établir le rôle joué par chacune de ces mutations.

En 2006-2009, nous avons développé des tests enzymatiques permettant d'étudier comparativement les activités catalytiques de la protéine KatG sauvage et des mutants de haut niveau (S315T, G494D, G121D, W341G, H270R, L141S, G118D, L336P, A162E, R595STOP) et de bas niveau de résistance (A110V, D189G, R249H, F658V, Q461P. Nous avons également entrepris une étude cristallographique de la protéine KatG afin d'analyser la localisation des mutations dans la structure 3D. Malgré un nombre important de tests de cristallogenèse, aucun cristal de qualité suffisante pour une analyse aux rayons X n'a été obtenu. C'est pourquoi nous avons en 2010 réalisé une étude *in silico* permettant d'évaluer la localisation des mutations à partir des structures 3D connues de plusieurs catalase-peroxydases, dont celles de *M.tuberculosis* (enzyme sauvage) et de *Burkholderia pseudomallei*. L'analyse structurale, basée sur la modélisation à partir de ces structures cristallographiques connues, révèle qu'il existe plusieurs sites au niveau de l'hème catalytique qui pourraient jouer un rôle clé non seulement dans la fixation de l'INH mais également pour l'activité catalasique et l'activité de formation de l'INH activé : (i) la poche de l'hème lié aux acides aminés His108 et His270 (le « cœur » catalytique de l'enzyme), (ii) un petit canal conduisant à la poche de l'hème dans la région qui contient la mutation la plus fréquemment retrouvée dans la résistance à l'INH (S315T), et (iii) un grand canal contenant des molécules d'eau et conduisant à la face distale de la poche de l'hème (visible sur la **Figure 15)**.

Les résultats obtenus ont été corrélés aux résultats des tests enzymatiques réalisés en 2009 et sont résumés sur le **Tableau 37**. Les mutations S315T, G118D, G121D, A162E, L141S, H270R, L336P et W341G, qui touchent les 3 sites proches de l'hème identifiés par l'analyse structurale, altèrent très fortement l'activité catalase et la formation de l'INH activé. Ces sites correspondent donc très vraisemblablement à la machinerie principale mise en œuvre par KatG pour activer l'INH. On note que l'activité peroxydase semble découplée, au moins en partie, de ces sites et est relativement bien

préservée dans ces mutants (**Tableau 38**). Elle pourrait faire intervenir d'autres sites/voies catalytiques qu'il faudra caractériser dans l'avenir. Par ailleurs, les mutations très éloignées du site de l'hème (D189G, R249H, G494D, Q461P et F658V) correspondent le plus souvent à des mutants de bas niveau de résistance probablement imputable à des perturbations plus générales du repliement et/ou de la stabilité de la protéine KatG. Finalement, le polymorphisme R463L, fréquemment observé chez les souches cliniques sensibles à l'INH et qui ne modifie pas les activités KatG, est également très éloigné du centre catalytique.
En conclusion, les premiers éléments obtenus à partir de l'analyse structure-fonction de la protéine KatG représentent une base solide pour l'interprétation de « l'antibiogramme moléculaire » de l'INH.

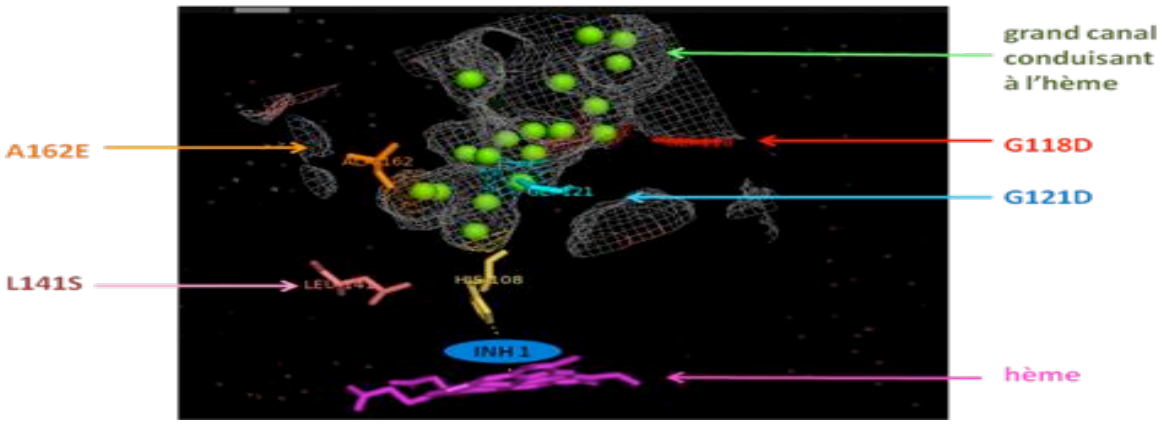


Figure 15 : Modèle 3D de la région du site catalytique de KatG de *M.tuberculosis*. L'hème est indiqué en rose, ainsi que le site de liaison de l'INH (en bleu). Le grand canal conduisant à l'hème et contenant des molécules d'eau est visualisé par un maillage gris, les molécules d'eau étant représentées par des sphères vertes. Quatre mutations sont montrées (G118D, G121D, A162E et L141S).

Mécanismes de résistance acquise à l'éthionamide chez *M.tuberculosis*

L'éthionamide (ETH) est une pro-drogue activée par la mono-oxygénase EthA dont la synthèse est placée sous contrôle d'une protéine régulatrice, EthR. L'ETH activé cible l'enzyme InhA impliquée dans la biosynthèse de la paroi mycobactérienne. La résistance à l'ETH résulte essentiellement de mutations altérant (i) le système d'activation EthA / EthR, et (ii) la cible de l'antibiotique InhA et le promoteur qui régule le niveau de synthèse de cette cible. Il a été suggéré que d'autres mécanismes pourraient intervenir dans la résistance à l'ETH, en particulier des mutations touchant la NADH déshydrogénase Ndh, ou encore l'enzyme MshA impliquées dans la biosynthèse des mycothiols**.**

En 2009, nous avons initié une étude visant à rechercher ces mutations dans 87 isolats cliniques comportant des souches résistantes à l'ETH (ETH-R, n=47), sensibles à l'ETH (ETH-S, n=24) ou caractérisées par un phénotype ETH-S mais présentant une proportion intermédiaire de cellules résistantes (ETH-Sip; défini comme > 1% mais <10% de cellules résistantes, n=16). Cette étude, dont les détails sont donnés dans le rapport 2009, a permis de montrer que la majorité des isolats ETH-R (81%) portent des mutations dans EthA, EthR ou InhA et son promoteur. Aucun des isolats ETH-R sans mutation détectable dans un de ces trois gènes (n=9, 19%) n'avait de mutation dans Ndh, un seul isolat ayant une mutation dans MshA. Pour les 16 isolats ETH-Sip, 7 avaient une mutation dans ethA et 8 n'avait pas de mutation détectable, excepté 1 dans MshA. Les 24 isolats ETH-S n'avait pas, pour l'ensemble des gènes étudiés, de mutation impliquée dans la résistance à l'ETH. Cette étude montre que la résistance à l'ETH chez *M.tuberculosis* est essentiellement liée à des mutations dans EthA, EthR ou InhA et son promoteur. Elle suggère que Ndh ne joue pas de rôle significatif dans le développement de la résistance à l'ETH. L'implication de MshA dans cette résistance n'a pas pu être clairement établie et nécessitera des études complémentaires. Enfin, cette étude a également permis de montrer que le mécanisme de résistance à l'ETH reste inconnu pour 19% des souches résistantes à ETH, ce qui souligne la complexité des mécanismes impliqués chez *M. tuberculosis*.

Ces résultats ont été soumis fin 2010 et publiés début 2011 : Brossier F, *et al.* Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jan;55(1):355-360.

Tableau 38 : Synthèse des résultats catalytiques et structuraux obtenus pour les différents mutants de KatG de *M.tuberculosis*. Les activités catalase, peroxydase, de formation de l'adduit INH-NAD et de formation du radical libre INH· sont exprimées en % par rapport à celles déterminées pour l'enzyme sauvage, fixées arbitrairement à 100%

Niveau de résistance à l'INH (CMI)	Mutation dans KatG	Localisation de la mutation dans la structure 3D de KatG	Catalase (%/KatG sauvage)	Peroxydase (%/KatG sauvage)	Formation INH-NAD (%KatG sauvage)	Production de radicaux libres (%KatG sauvage)
Sensible	wt		100 ±3	100 ±3	100 ±2	100 ±4
	R463L	Eloigné du site catalytique Exposé au solvant	79 ±5	89 ±3	86 ±1	102 ±3
Bas niveau (≥0.2, <1)	A110V	Proche de l'adduit covalent M255-Y229-W107	71 ±2	198 ±2	40 ±2	73 ±2
	D189G	Eloigné du site catalytique	53 ±9	59 ±1	60 ±1	49 ±4
	R249H	Eloigné du site catalytique	74 ±3	77 ±2	69 ±2	81 ±7
	F658V	Eloigné du site catalytique	83 ±2	109 ±3	78 ±2	88 ±7
	Q461P	Eloigné du site catalytique	44 ±1	58 ±1	71 ±5	45 ±3
Haut niveau (≥1, <10 mg/l)	G494D	Eloigné du site catalytique	43 ±2	72 ±2	70 ±4	52 ±2
	S315T	Entrée d'un petit canal conduisant à la poche de l'hème	55 ±2	70 ±4	10 ±1	9 ±1
	G121D	Au contact d'un grand canal conduisant à la poche de l'hème	14 ±0,2	44 ±1	21 ±4	7 ±1
Très haut niveau (≥10 mg/l)	A162E	Au contact d'un grand canal conduisant à la poche de l'hème	70 ±2	118 ±2	56 ±1	26 ±3
	L141S	Proche de l'hème	2 ±0,2	45 ±4	31 ±2	14 ±5
	G118D	Au contact d'un grand canal conduisant à la poche de l'hème	<0,1%	30 ±1	29 ±4	8 ±2
	W341G	Proche de la poche proximale de l'hème	<0,1%	34 ±2	41 ±2	13 ±1
	L336P	Proche de la poche proximale de l'hème	<0,1%	25 ±2	15 ±1	19 ±2
	H270R	Liaison directe avec l'hème dans La poche proximale	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%
	R595STOP	Délétion de la partie C-terminale de KatG	<0.1%	21 ±1	12 ±2	14 ±1

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

L'objectif est d'explorer par des outils moléculaires les souches de *M.tuberculosis* MDR pour savoir rapidement si elles sont ou non sensibles aux quinolones. Pour cela nous disposons depuis 2004 d'un outil fiable (ADN gyrase produite par génie génétique) permettant de tester l'implication de nouvelles mutations de l'ADN gyrase dans la résistance aux quinolones.
Ceci a permis une structurale de la résistance aux quinolones de *M.tuberculosis* (Pitton J, PlosOne 2010 ; 5(8) : e12245).

Nous avons montré que les mutations GyrB-D473N, P478A, R485H, S486F, A506G, A543V, A547V, G551R et G559A ne sont pas impliquées dans la résistance aux quinolones chez *M.tuberculosis* (CI_{50} de l'enzyme identiques à celles de l'enzyme sauvage, souches sensibles à l'ofloxacine), contrairement aux mutations S486Y, D500A, N538K,T, T539P et E540V qui, elles, sont impliquées dans un bas niveau de résistance aux quinolones (CMI et CI_{50} augmentées d'un facteur 2,5 à 32 par rapport à celles de la souche et de l'ADN gyrase sauvages de *M.tuberculosis*).
Ces résultats sont soumis à publication.

Mécanisme de résistance aux macrolides chez *M. abscessus* complex

M.abscessus est une mycobactérie atypique émergente ces dernières années, responsable d'infections broncho-pulmonaires chez des patients ayant une pathologie respiratoire chronique, en particulier la mucoviscidose. Le traitement antibiotique de ces infections est peu efficace et non standardisé, en particulier à cause de la multi-résistance naturelle de M. abscessus à de très nombreux antibiotiques y compris à la clarithromycine, qui est pourtant aujourd'hui le traitement de référence.

Nous avons étudié la sensibilité et la résistance à la clarithromycine de 87 souches cliniques de *M.abscessus,* dont 61% avaient été isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. En étudiant systématiquement le gène *rrl* codant pour l'ARN ribosomal 23S, molécule cible de l'activité de la clarithromycine et le gène *erm41* qui code pour une enzyme (ARN méthylase) empêchant la clarithromycine d'agir sur l'ARNr23S, nous avons montré qu'il y avait une bonne concordance entre les séquences de ces 2 gènes et la résistance ou la sensibilité à la clarithromycine.

Nous avons d'abord montré que toutes les souches qui n'avaient pas un gène *erm41* fonctionnel, soit parceque le gène était partiellement délété soit parce qu'il contenait une cytosine en position 28 (sequevar C28), la souche était sensible à la clarithromycine (CMI ≤ 1 mg/L). Nous avons aussi montré que les souches qui avaient un gène *erm41* intact et était de sequevar T28, avaient un niveau moyen de résistance à la clarithromycine (CMI > 16 mg/L).

Une étude phylogénétique menée sur les mêmes souches a permis de répartir précisément les souches selon les 3 sous espèces, *M.abscessus* sensu stricto, *M.massiliense* et *M.bolleti.* Nous avons montré que tous les *M.massiliense* avaient un gène *erm41* délété (sensibilité naturelle), que tous les *M.bolletii* avaient un gène *erm41* intact de sequevar T28 (résistance naturelle de niveau moyen) et que les *M.abscessus* sensu stricto se divisaient en 2 sequevars : T28 (résistance naturelle de niveau moyen) et C28 (sensibilité naturelle). Toutes les souches de l'espèce *M.abscessus* sensu stricto n'ont donc pas le même comportement naturel vis-à-vis de la clarithromycine, certaines étant naturellement sensibles et d'autres naturellement résistantes, ce qui explique les différences d'efficacité thérapeutique rapportées d'une étude à l'autre, voire d'un patient à l'autre

Par l'étude des mutations du gène *rrl*, nous avons aussi montré que toutes les souches anormales portant une mutation aux positions 2058 (A2058C, A2058G ou A2058T) ou 2059 (A2059C, A2059T) avaient une résistance acquise de très haut niveau (CMI> 256 mg/L) à la clarithromycine.

Enfin, sur un plan des techniques de laboratoires, nous avons montré que les tests phénotypiques mesurant la sensibilité pouvaient donner des réponses de « fausse sensibilité » lorsque l'incubation était insuffisamment longue, du fait du mécanisme inductible de résistance via le gène *erm*, ce qui explique les discordances rapportées pour la sensibilité à la clarithromycine par différentes études pour les mêmes souches de référence.

Ces résultats ont été soumis fin 2010 et publiés début 2011.

Bastian S, *et al*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):775-81.
Macheras E, *et al.* J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):491-9.

E. Publications et communications du CNR-MyRMA 2006-2011

E.1. Publications nationales

- C. TRUFFOT-PERNOT, CAMBAU E., TRYSTRAM D., JARLIER V. 2006. *Mycobacterium tuberculosis.* Encyclopédie médico-biologique. Editions Elsevier.
- E. CAMBAU, TRUFFOT-PERNOT C., AUBRY A., TRYSTRAM D., JARLIER V. 2006. Diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries atypiques. Encyclopédie médico-biologique, Editions Elsevier.
- N. VEZIRIS, AUBRY A., TRUFFOT-PERNOT C. Argumentation sur la durée des traitements antituberculeux. Presse Med. 2006 Nov;35(11 Pt 2):1758-64.
- C. TRUFFOT-PERNOT, VEZIRIS N., SOUGAKOFF W. Diagnostic moderne de la tuberculose Presse Med. 2006 Nov;35(11 Pt 2):1739-46.
- J.L. HERRMANN, SIMONNEY N. and LAGRANGE P.H. Advantages and drawbacks of in vitro Interferon-gamma/T cell assays compared to the Mantoux test for the diagnosis of tuberculosis.,Arch Pediatr 2007;14:207-11.
- P.H. LAGRANGE, SIMONNEY N. and HERRMANN J.L. New immunological tests in the diagnosis of tuberculosis. Rev Mal Respir 2007;24:453-72.
- J. ROBERT, VEZIRIS N., TRUFFOT-PERNOT C., GRIGORESCU C, JARLIER V. Surveillance de la résistance aux antituberculeux en France : données récentes. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 2007 (11):91-92.
- N. VEZIRIS, JARLIER V. Les nouveaux antituberculeux. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 2008 (10-11) : 72-74.
- S. REGNIER, MARTINEZ V., VEZIRIS N., BONVALLOT T., MENINGAUD J.P., CAUMES E. Treatment of cutaneous infections due to *Mycobacterium fortuitum*: two cases. Ann Dermatol Venereol. 2008 Aug-Sep;135(8-9):591-5. Epub 2008 Jul 26.
- J.L. HERRMANN, SIMONNEY N., BERGERON A., DUCREUX-ADOLPHE N., PORCHER R., ROUVEAU M., ALLEZ M., LEPORTIER M., TAZI A., LEMANN M. and LAGRANGE P.H. IFNgamma and antibody responses among French nurses during a tuberculosis contact tracing investigation. Pathol Biol (Paris) 2008 Apr 3.
- J. ROBERT, VEZIRIS N., réseau Azay-Mycobactérie et le Conseil Scientifique de l'ONERBA. Resistance to antituberculosis drug in France; data provided by the Azay-Mycobacteria network and the National Reference Center on Mycobacteria]. Med Mal Infect. 2008 Jun;38 Suppl 2:S68-70.
- N. VEZIRIS, ROBERT J. Faut-il craindre la tuberculose à bacilles ultra-résistants en France ? (Editorial) La Lettre de l'Infectiologue 2009;24:4-6.
-N VEZIRIS, V JARLIER. Les nouveaux antituberculeux. Feuillets de biologie. 2009, vol. 50, n°290, pp. 80-82
- N. VEZIRIS, S. BASTIAN. Nouveaux outils du diagnostic de la tuberculose dans « 33 nouveaux concepts et méthodes qui ont marqué l'évolution de la pneumologie ces 15 dernières années ». Volume 3. Editions scientifiques L et C.2009.
- W. SOUGAKOFF. Nouvelles cibles bactériennes pour les mycobactéries. 2009. Antibiotiques Sept;11(3) :164-170.
- N. LOUNIS, GUILLEMOT J., VEZIRIS N., KOUL A., JARLIER V., ANDRIES K. [R207910 (TMC207): A new antibiotic for the treatment of tuberculosis.]. Med Mal Infect. 2009 Nov 30.
- N. VEZIRIS, J. ROBERT. Résistance aux antituberculeux et impasse thérapeutique. Médecine et Sciences 2010 ; 26 :976-80.
- N. VEZIRIS. Infection broncho-pulmonaire à *Mycobacterium avium complex.* Revue des Maladies Respiratoires Actualités (2) 2.p103-7. 2010
- N. VEZIRIS, AUBRY A., ROBERT J., CAMBAU E., JARLIER V., TRUFFOT-PERNOT C. Chapître «Mycobactéries ». Dans "l'Antibiogramme, 3e edition, Ed ESKA. 2011.
- C. TRUFFOT-PERNOT, VEZIRIS N. Les tests bactériologiques de la tuberculose maladie : standards et perspectives. Revue des Maladies Respiratoires, 2011.
- LERAT I, TRUFFOT C, VEZIRIS N. Infections à Mycobacterium abscessus : épidémiologie, aspects cliniques et traitement. Journal des Anti-infectieux (2011) 13, 49-55.

E.2. Publications internationales

- C. PULCINI, VANDENBUSSCHE E., PODGLAJEN I., SOUGAKOFF W., TRUFFOT-PERNOT C., BUU-HOI A., VARON E, MAINARDI J.L. Hip prosthesis infection due to *Mycobacterium wolinskyi*. J Clin Microbiol. 2006 Sep;44(9):3463-4.
- D. SRIRAM, AUBRY A., P. YOGEESWARI, L.M. FISCHER. Derivatives: Synthesis, Antimycobacterial Activities and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase. Gatifloxacin Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006,16(11) : 2982-5. (IF2006 2,538).
- G. ANQUETIN, GREINER J., MAHMOUDI N., SANTILLANA-HAYAT M., GOZALBES R., FARHATI K., DEROUIN F., AUBRY A., CAMBAU E., VIERLING P. Design, synthesis and activity against *Toxoplasma gondii*, Plasmodium spp., and *Mycobacterium tuberculosis* of new 6-fluoroquinolones. Eur J Med Chem. 2006 ;41(12) : 1478-93. (IF2006 2,187).
- N. CHAI, DEFORGES L., SOUGAKOFF W., TRUFFOT-PERNOT C., DE LUZE, B. DEMENEIX A., CLEMENT M.,. BOMSEL M.C. *Mycobacterium szulgai* infection in a captive population of African clawed frogs (Xenopus tropicalis). J Zoo Wildl Med. 2006 Mar ; 37(1) : 55-8.
- A. AUBRY, VEZIRIS N., CAMBAU E., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., FISHER L.M. Novel gyrase mutations in Quinolone-resistant and –hypersusceptible clinical solates of *M. tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 2006 ; 50 (1) : 1558-60.
- M. IBRAHIM, ANDRIES K., LOUNIS N., CHAUFFOUR A., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., VEZIRIS N. Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide in murine tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother 2006 Dec 18.
- MATRAT, VEZIRIS N., MAYER C., JARLIER V., TRUFFOT-PERNOT C., CAMUSET J., BOUVET E., CAMBAU E., AUBRY A. Functional analysis of DNA gyrase mutant enzymes carrying mutations at position 88 in the A subunit found in clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones.Antimicrob. Agents Chemother 2006 ; 50 : 4170-3.
- S. LEFRANÇOIS, ROBERT J., CHAUFFOUR A., JI B., JARLIER V.Curing *Mycobacterium ulcerans* infection in mice with combination of rifampicin-streptomycin or rifampicin-amikacin. Antimicrob. Agents Chemother 2006 ; 51 : 645-50.
- E.GUERRIN-TRAN, THIOLET J.M., ROUSSEAU C., HENRY S., POIRIER C., CHE D., VINAS J.M., JARLIER V., ROBERT J. An evaluation of data quality in a network for surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to antituberculosis drugs in Ile-de-France region-2001-2002. Eur J. Epidemiol 2006 ; 21 : 783-785.
- F. BROSSIER, VEZIRIS N., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., SOUGAKOFF W. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low – and high-level resistance. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 3659-64.
- A. AUBRY, FISCHER L.M., JARLIER V., CAMBAU E. First functional characterization of a singly expressed bacterial type II topoisomerase : the enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*.
Biochem Biophys Res Commun 2006 ; 348 : 158-65
- S. PETRELLA, CAMBAU E., CHAUFFOUR A., ANDRIES K., JARLIER V., SOUGAKOFF W. Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother 2006 ; 50 : 2853-6.
- N. LOUNIS, VEZIRIS N., CHAUFFOUR A., TRUFFOT-PERNOT C., ANDRIES K., JARLIER V. Combinations of R207910 with drugs used to treat multidrug-resistant tuberculosis have the potential to shorten treatment duration. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Nov;50(11):3543-7.
- B. JI, LEFRANÇOIS S., ROBERT J., CHAUFFOUR A., TRUFFOT C., JARLIER V. In vitro and in vivo activities of rifampin, streptomycin, amikacin, moxifloxacin, R207910, linezolid, and PA-824 against *Mycobacterium ulcerans*. Antimicrob. Agents Chemother 2006 ; 50 : 1921-6.
- J. CHEMARDIN, PATY M.C., RENARD-DUBOIS S., VEZIRIS N., ANTOINE D. Contact tracing of passengers exposed to an extensively drug-resistanttuberculosis case during an air flight from Beirut to Paris. Euro Surveill. 2007 Dec 6;12(12):E071206.2.
- M. IBRAHIM, ANDRIES K., LOUNIS N., CHAUFFOUR A., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., VEZIRIS N. Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother 2007 ; 51 : 1011-5.
- M.L. UFFREDI, TRUFFOT-PERNOT C., DAUTZENBERG B., RENARD M., JARLIER V, ROBERT J. An intervention programme for the management of multidrug-resistant tuberculosis in France. Int. J. Antimicrob Agents. 2007 ; 29 : 434-9.
- N. VEZIRIS, MARTIN C., BROSSIER F., BONNAUD F., DENIS F., AUBRY A. Treatment failure in a case of extensively drug-resistant tuberculosis associated with selection of a GyrB mutant causing fluoroquinolone resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007, 26(6) : 423-5.

- S. MATRAT, PETRELLA S., CAMBAU E., SOUGAKOFF W., JARLIER V., AUBRY A. Expression and purification of an active form of the *Mycobacterium leprae* DNA gyrase and ist inhibition by quinolones. Antimicrob. Agents Chemother 2007 ; 51 : 1643-8.
- P.M. KHUË, TRUFFOT-PERNOT C., TEXIER-MAUGEIN J., JARLIER V., ROBERT J. A 10-year prospective surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in France 1995-2004.
Eur. Respir. J. 2007 ; 30 : 937-44
- B. JI, CHAUFFOUR A., ROBERT J., LEFRANÇOIS S., JARLIER V. Orally administered combined regimens for treatment of *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 2007 ; 51 : 3737-9.
- X. DRAY, VAHEDI K., DELCEY V., LAVERGNE-SLOVE A., RASKINE L., BERGMANN J.F., MARTEAU P. *Mycobacterium avium* duodenal infection mimicking Whipple's disease in a patient with AIDS. Endoscopy. 2007 Feb ; 39 Suppl 1 : E296-7.
- N. SIMONNEY, CHAVANET P., PERONE C., LEPORTIER M., REVOL F., HERRMANN J.L. and LAGRANGE Ph. B-cell immune responses in HIV positive and HIV negative patients with tuberculosis evaluated with an ELISA using a glycolipid antigen. Tuberculosis (Edinb) 2007 ; 87 109-22.
- P.M. KHUE, MALLET A., VEZIRIS N., JARLIER V., ROBERT J. Azay-Mycobacteria Study Group Evaluation of data quality in a laboratory-based surveillance of *M.tuberculosis* drug resistance and impact on the prevalence of resistance : France, 2004. Epidemiol. Infect. 2008 ; 136 : 1172-8.
- S. MATRAT, CAMBAU E., JARLIER V., AUBRY A. Are all the DNA gyrase mutations found in *Mycobacterium leprae* clinical strains involved in resistance to fluoroquinolones ? Antimicrob. Agents Chemother. 2008 ; 52 : 745-7.
- K.R. N'GUESSAN, DOSSO M., EKAZA E., KOUAKOU J., JARLIER V. Molecular characterisation of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from new cases in Lagunes region (Côte d'Ivoire). Int. J. Antimicrob. Agents. 2008 ; 31 : 498-500.
- M. LAVOLLAY, ARTHUR M., FOURGEAUD M., DUBOST L., MARIE A., VEZIRIS N., BLANOT D., GUTMANN L., MAINARDI J.L. The Peptidoglycan of Stationary Phase *Mycobacterium tuberculosis* Predominantly Contains Cross-links Generated by L,D-Transpeptidation. J. Bacteriol. 2008 Jun;190(12):4360-6. Epub 2008 Apr 11.
- B. JI, CHAUFFOUR A., ROBERT J., JARLIER V. Bactericidal and sterilizing activities of several orally administered combined regimens against *Mycobacterium ulcerans* in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 2008 ; 52 : 1912-6.
- S. MATRAT, AUBRY A., MAYER C., JARLIER V., CAMBAU E. Mutagenesis in the alpha3alpha4 Gyr A helix and in the Toprim domain of GyrB refines the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase to intrinsic resistance to quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 2008 ; 52 : 2909-14.
- P.M. KHUE, PHUC T.Q, HUNG N.V., JARLIER V., ROBERT J. Drug resistance and HIV co-infection among pulmonary tuberculosis patients in Haiphong City, Vietnam. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2008 ; 12 : 763-8
- K. AISSA, MADHI F., RONSIN N., DELAROCQUE F., LECUYER A., DECLUDT B., REMUS N., ABEL L., POIRIER C., DELACOURT C.; CG94 Study Group (Cambau E) Evaluation of a model for efficient screening of tuberculosis contact subjects. Am J Respir Crit Care Med. 2008 May 1 ; 177(9) : 1041-7.
- N. SIMONNEY, DEWULF G., HERRMANN J.L., GUTIERREZ M.C., VICAUT E., BOUTRON C., LEPORTIER M., LAFAURIE M., ABGRALL S., SERENI D., AUTRAN B., CARCELAIN G., BOURGARIT A. and LAGRANGE Ph. Anti-PGL-Tb1 responses as an indicator of the immune restoration syndrome in HIV-TB patients. Tuberculosis (Edinb) 2008 ; 88 : 453-61.
- B. JI, CHAUFFOUR A., AUBRY A., ROBERT J., IBRAHIM M., JARLIER V. Impacts of dosing frequency of the combination rifampin-streptomycin on its bactericidal and sterilizing activities against *Mycobacterium ulcerans* in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2009 ; 53 : 2955-9.
- A. MERENS, MATRAT S., AUBRY A., LASCOLS C., JARLIER V., SOUSSY C.J., CAVALLO J.D., CAMBAU E. The pentapeptide repeat proteins MfpAMt and QnrB4 exhibit opposite effects on DNA gyrase catalytic reactions and on the ternary gyrase-DNA-quinolone complex. J. Bacteriol. 2009 ; 19 : 1587-94.
- N. VEZIRIS, IBRAHIM M., LOUNIS N., CHAUFFOUR A., TRUFFOT-PERNOT C., ANDRIES K., JARLIER V. A once-weekly R207910-containing regimen exceeds activity of the standard daily regimen in murine tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2009 ; 179 : 75-9.
- F. BROSSIER, VEZIRIS N., JARLIER V., SOUGAKOFF W. Performance of MTBDR plus for detecting high/low levels of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to isoniazid. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2009 ; 13 : 260-5.
- A. CARBONNE, BROSSIER F., ARNAUD I., BOUGMIZA I., CAUMES E., MENINGAUD J.P., DUBROU S., JARLIER V., CAMBAU E., ASTAGNEAU P. Outbreak of nontuberculous Mycobacteria

subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. J. Clin. Microbiol. 2009 ; 47 : 1961-4.
- S. REGNIER, OUAGARI Z, PEREZ Z.L., VEZIRIS N., BRICAIRE F., CAUMES E. Cutaneous miliary resistant tuberculosis in a patient infected with human immunodeficiency virus: case report and literature review. Clin Exp Dermatol. 2009 Dec;34(8):e690-2. Epub 2009 Jul 29.
- J. PITON, MATRAT S., PETRELLA S., JARLIER V., AUBRY A., MAYER C. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiments on the breakage-reunion domain of the DNA gyrase from *Mycobacterium tuberculosis*. Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 2009 ; 65 : 1182-6.
- M. IBRAHIM, TRUFFOT-PERNOT C., ANDRIES K., JARLIER V., VEZIRIS N. Sterilizing activity of 5207910 (TMC207)-containing regimens in the murine model of tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2009 ; 180 : 553-7.
- B. JI, CHAUFFOUR A., AUBRY A., ROBERT J., IBRAHIM M., JARLIER V. Impacts of dosing frequency of the combination rifampin-streptomycin on its bactericidal and sterilizing activities against Mycobacterium ulcerans in mice. Antimicrob Agents Chemother. 2009 ; 53 : 2955-9.
- L. ARNAUD, CAMBAU E., BROCHERIOU I., KOSKAS F., KIEFFER E., PIETTE J.C, AMOURA Z. Absence of Mycobacterium tuberculosis in arterial lesions from patients with Takayasu's arteritis.
J Rheumatol. 2009 Aug ; 36(8) : 1682-5.
- S. REGNIER, CAMBAU E., MENINGAUD J.P., GUIHOT A., DEFORGES L., CARBONNE A., BRICAIRE F. Clinical management of rapidly growing mycobacterial cutaneous infections in patients after mesotherapy. Clin Infect Dis. 2009 Nov 1 ; 49(9) : 1358-64.
- P. SELLIER, DELCEY V., RASKINE L., SANSON-LE-PORS M.J., BERGMANN J.F. Moxifloxacin versus ethambutol in initial tuberculosis treatment. Lancet. 2009 Jun 27 ; 373(9682) : 2198 ; author reply 2198-9. No abstract available.
- J.L. HERRMANN, BELLOY M., PORCHER R., SIMONNEY N., ABOUTAAM R., LEBOURGEOIS M., GAUDELUS J., DE LOSANGELES L., CHADELAT K., SCHEINMANN P., BEYDON N., FAUROUX B., BINGEN M., TERKI M., BARAUD D., CRUAUD P., OFFREDO C., FERRONI A., BERCHE P., MOISSENET D., VUTHIEN H., DOIT C., BINGEN E., LAGRANGE Ph.Temporal dynamics of interferon gamma responses in children evaluated for tuberculosis. PLoS One. 2009 ; 4(1) : e4130.
- S. BASTIAN, BROSSIER F., WICHLACZ C., JARLIER V., VEZIRIS N. Daptomycin is not active against rapidly growing Mycobacteria. J. Med. Microbiol. 2010 ; 59 : 135-6.
- F. BROSSIER, VEZIRIS N., AUBRY A., JARLIER V., SOUGAKOFF. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis complex* W.isolates. J. Clin. Microbiol. 2010 ; 48 : 1683-9.
- C. BOUAKAZE, KEYSER C., DE MARTINO S.J., SOUGAKOFF W., VEZIRIS N., DABERNAT H., LUDES B. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex species by use of a SNaPshot Minisequencing-based assay. J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1758-66. Epub 2010 Mar 10.
- J. PITON, PETRELLA S., DELARUE M., ANDRE-LEROUX G., JARLIER V., AUBRY A., MAYER C. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. PlosOne 2010 ; 5(8) : e12245.
- J. POISSY, AUBRY A., FERNANDEZ C., LOTT M.C., CHAUFFOUR A., JARLIER V., FARINOTTI R., N. VEZIRIS. Should moxifloxacin be used for the treatment of XDR-TB? An answer from the murine model. Antimicrob Agents Chemother. 2010 ; 54(11) : 4765-71.
- N. RADOMSKI, CAMBAU E., MOULIN L., HAENN S., MOILLERON R., LUCAS F.S. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. Appl Environ Microbiol 2010, 76 : 3514-20.
- N. RADOMSKI, LUCAS F.S., MOILLERON R., CAMBAU E., HAENN S., MOULIN L. Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium spp*. in surface water. Appl Environ Microbiol. 2010 Nov ; 76(21) : 7348-51.
- P. CLEVENBERGH, MAITREPIERRE I., SIMONEAU G., RASKINE L., MAGNIER J.D., SANSON-LE-PORS M.J., BERGMANN J.F., SELLIER P. Lymph node tuberculosis in patients from regions with varying burdens of tuberculosis and human immunodeficiency virus (HIV) infection. Presse Med. 2010 Oct ; 39(10) : e223-30. Epub 2010 Jun 19.
- H. MAN, SELLIER P., BOUKOBZA M., CLEVENBERGH P., DIEMER M., RASKINE L., DELCEY V., SHAH M., SIMONNEAU G., MOULY S., BERGMANN J.F. Central nervous system tuberculomas in 23 patients. Scand J Infect Dis. 2010 Jul ; 42(6-7) : 450-4.
- E. SBIDIAN, KRAMKIMEL N., ROUTIER E., BULARCA S., DUONG T.A., ROUJEAU J.C., LEGRAND P., DEFORGES L., BAGOT M. Nosocomial disseminated *Mycobacterium chelonae*

infection in an immunocompromised patient. Eur J Dermatol. 2010 May-Jun ; 20(3) : 407. Epub 2010 Feb 10.

- M. LAGRANGE-XELOT, PORCHER R., GALLIEN S., WARGNIER W., PAVIE J., de CASTRO N., MOLINA J.M. Prevalence and clinical predictors of pulmonary tuberculosis among isolated inpatients: a prospective study. Clin Microbiol Infect. 2010 May 3.
- C. DESHAYES, BACH H., EUPHRASIE D., ATTARIAN R., COUREUIL M., SOUGAKOFF W., LAVAL F., AV-GAY Y., DAFFE M., ETIENNE G., REYRAT J.M. MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol. 2010 Nov;78(4):989-1003.
- A. LOTZ, FERRONI A., BERETTI J.L., DAUPHIN B., CARBONNELLE E., GUET-REVILLET H., VEZIRIS N., HEYM B., JARLIER V., GAILLARD J.L., PIERRE-AUDIGIER C., FRAPY E., BERCHE P., NASSIF X., BILLE E. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2010 Dec;48(12):4481-6. Epub 2010 Oct 13.
- S. BASTIAN, VEZIRIS N., ROUX A.L., BROSSIER F., GAILLARD J.L., JARLIER V., CAMBAU E. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by erm(41) and rrl sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):775-81. Epub 2010 Dec 6.
- M. TOCHON, BOSDURE E., SALLES M., BELONCLE C., CHADELAT K., DAGORNE M., GAUDELUS J., LOSI S., RENOUX M.C., VEZIRIS N., DUBUS J.C. Management of young children in contact with an adult with drug-resistant tuberculosis, France, 2004-2008. Int J Tuberc Lung Dis. 2011 Mar;15(3):326-30.
- B. CRIBIER, AUBRY A., CAUMES E., CAMBAU E., JARLIER V., CHOSIDOW O. Histopathological study of *Mycobacterium marinum* infection. Ann Dermatol Venereol. 2011 Jan ; 138(1) : 17-22.
- F. BROSSIER, VEZIRIS N., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., SOUGAKOFF W. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jan;55(1):355-60. Epub 2010 Oct 25.
- N. VEZIRIS, IBRAHIM M., LOUNIS N., ANDRIES K., JARLIER V. Sterilizing Activity of Second-Line Regimens Containing TMC207 in a Murine Model of Tuberculosis. PLoS ONE 2011; 6(3): e17556.
- E. MACHERAS, ROUX A.L., BASTIAN S., S.C.LEAO, PALACI M., SIVADON-TARDY V., GUTIERREZ C., RICHTER E., RUSCH-GERDES S., PFYFFER G., BODMER T., CAMBAU E., GAILLARD J.L., HEYM B. Multilocus sequence analysis and *rpoB* sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. J Clin Microbiol. 2011 Feb ; 49(2) : 491-9.
- S. PETRELLA, GELUS-ZIENTAL N., MAUDRY A., LAURANS C., BOUDJELLOUL R., SOUGAKOFF W. Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. PLoS One. 2011 Jan 24;6(1):e15785.
- A. SADATH, AUBRY A., SURESH PANDIAN PANKAJ SARASWAT ABHIMANYU SINGH AND RAMAKANT GAUR. ASHRAF ALI M., BASTIAN S., ISMAI R., SOO CHOO T. Discovery of novel methanone derivatives acting as antimycobacterial agents. J Enz Inhib Med Chem., 2011, 1-5, Early Online.
- E. CAMBAU, AUBRY A. *Mycobacterium marinum*. In "Tuberculosis and mycobacterial infections", Ed. D. Schlossberg, 2011, ASM Press, Washington DC.

E.3. Communications nationales

- J. ROBERT, TRUFFOT-PERNOT C., VEZIRIS N., GRIGORESCU C., JARLIER V. Modifications des caractéristiques épidémiologiques de la tuberculose multirésistante en France en 2002-2003. 6èmes journées nationales d'infectiologie, Nice, 2005.
- N. VEZIRIS, TRUFFOT C., LOUNIS N., CHAUFFOUR A., ANDRIES K., et JARLIER V. R207910 : un nouvel antibiotique prometteur dans la tuberculose multirésistante. 6èmes journées nationales d'infectiologie, Nice, 2005.
- S. MATRAT*, PETRELLA S., CAMBAU E., SOUGAKOFF W., JARLIER V. et AUBRY A. Expression et purification de l'ADN gyrase de *Mycobacterium leprae* et étude de son inhibition par les quinolones. Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, 2006
- A. SFEZ, CHADELAT K., ROBERT J., DELACOURT C., VEZIRIS N. Prise en charge des enfants au contact de patients suivis pour tuberculose pulmonaire multirésistante. 10ème congrès de pneumologie de langue française, Nice, France 2006.

- N. VEZIRIS, TRUFFOT C., LOUNIS N., CHAUFFOUR A., ANDRIES K. et JARLIER V. R207910 : un nouvel antibiotique prometteur pour le traitement de la tuberculose. 10ème congrès de pneumologie de langue française, Nice, France 2006.
- J. ROBERT, TRUFFOT-PERNOT C., VEZIRIS N., GRIGORESCU C., JARLIER V. Modifications des caractéristiques épidémiologiques de la tuberculose multirésistante en France en 2002-2003. 10ème congrès de pneumologie de langue française, Nice, France 2006.
- A. MERENS*, MATRAT S., LASCOLS C., AUBRY A., JARLIER V., SOUSSY J.C., CAVALLO J.D., CAMBAU E. Interaction des protéines à motifs pentapeptidiques répétés MtMfpA et Qnr avec l'ADN gyrase. 27eme Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris. 2007.
- J POISSY, AUBRY A., JARLIER V., VEZIRIS N. *in vivo* Activity of moxifloxacin on *Mycobacterium tuberculosis* resistant to ofloxacine. 27ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris, France 2007.
- J. POISSY, AUBRY A., JARLIER V., VEZIRIS N. Evaluation in vivo de l'activité de la moxifloxacine sur des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à l'ofloxacine. 10èmes Journées internationales de Mycobactériologie de Langue Française. Lyon. 2007.
- F. BROSSIER, JARLIER V. et SOUGAKOFF. W.. Evaluation du test Genotype MTBDR*plus*, une nouvelle version du test MTBDR pour la détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide chez Mycobacterium tuberculosis. 27e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris. 2007.
- P. BEMER, TRUFFOT-PERNOT C., SOUGAKOFF W., GOUZE'H M.J., et CHAMOUX C. Polymorphisme cultural et génétique d'une souche de Mycobacterium tuberculosis multirésistante aux antituberculeux. 27e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris. 2007.
- V. BROUTIN, BANULS A.L., KECK N., AUBRY A., CAMBAU E., STAGIER P., PORTAELS F., TERRU D., VAN DE PERRE P., GODREUIL S. Etude de la diversité génétique de *M.marinum* chez l'homme et le poisson en France. Journées internationales de Mycobactériologie de Langue Française. Lyon. Communication orale. 2007.
- E. CAMBAU, BETTELI L., RADOMSKI, HAENN S., MOULIN L., LUCAS F. Détection des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau. 10eme Journées de Veille sanitaire, novembre 2008, Paris.
- N. VEZIRIS, IBRAHIM M., TRUFFOT-PERNOT C., ANDRIES K., JARLIER V. La diarylquinoline R207910 permet de raccourcir la durée du traitement de la tuberculose dans le modèle murin. 12ème congrès de pneumologie de langue française, Lille, France 2008.
- E. KANITZ, VEZIRIS N., JARLIER V., GUTIERREZ M.C., ROBERT J. Dix ans de tuberculose XDR en France : incidence et facteurs de risque. 28ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris, France 2008.
- A. PREVOTAT, BONNE S., FORTIN F., VEZIRIS N., SENNEVILLE E., YAZDANPANAH Y., LEGOUT L. Infection pulmonaire à *Mycobacterium abscessus* : place des nouvelles molécules. 28ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris, France 2008.
- L. RASKINE. Etude comparative de système d'identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF. 29ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris, France 2009.
- P. BEMER, GOUZERH M.J., BESSON C., VEZIRIS N., SOUGAKOFF W., REYNAUD A. Détection de la résistance à l'isoniazide chez *Mycobacterium tuberculosis* : comparaison du système BACTEC MGIT960 (MGIT960), de la méthode des proportions en milieu solide (MP) et du test GenoType MTBDR *plus* (MTBDR *plus*). 29ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris, France 2009.
- F. BROSSIER, VEZIRIS N., JARLIER V., SOUGAKOFF W. Etudes biochimiques et structurales des nouvelles mutations KatG trouvées dans des souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à l'isoniazide. 8ème Congrès national de la Société Française de Microbiologie. Marseille, France 2010.
- N. VEZIRIS, AUBRY A., POISSY J., TRUFFOT C., MAINARDI J.L., JARLIER V. Evaluation dans le modèle murin d'antibiothérapies pour les tuberculoses XDR. 8ème Congrès national de la Société Française de Microbiologie. Marseille, France 2010.
- A. PANTEL, BROSSIER F., BASTIAN S., VEZIRIS N., REITTER D., JARLIER V., AUBRY A. Etude de l'impact des mutations de la sous unité B de l'ADN gyrase de M.tuberculosis sur la sensibilité aux quinolones. Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Communication orale. 2010.

E.4. Communications internationales

- S. MATRAT*, AUBRY A., MAYER C., JARLIER V., CAMBAU E. DNA gyrase residues involved in intrinsic resistance to quinolones of *Mycobacterium tuberculosis* International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, September 2006.
- S. MATRAT*, CAMBAU E., JARLIER V., AUBRY A. Function of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase requires the excision of the Intein. 47th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, September 2007.
- E. CAMBAU*, TEJMAR-KOLAR L, CHAUFFOUR-NEJEVANS A., DIT BETTONI R., JARLIER V. Surveillance of antibiotic resistance in leprosy by a new molecular test, the GenoType LepraeDR. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, 2010.
- J. ROBERT, TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., CAMBAU E., AUBRY A. Clinical and microbiological data of patients infected with multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains carrying gyrase mutations. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Nice. 2006.
- S. MATRAT, VEZIRIS N., JARLIER V., CAMBAU E., TRUFFOT-PERNOT C., CAMUSET J., BOUVET E., AUBRY A. New mutation at the position 81 in GyrA in clinical strains of *Mycobacterium. tuberculosis* resistant to quinolone: report of two clinical cases and functional analysis of DNA gyrase mutant enzymes. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Nice. 2006.
- A. AUBRY, CHAUFFOUR A., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., VEZIRIS N. Emergence of fluoroquinolone resistance in the murine model of tuberculosis. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich, 2007.
- W. SOUGAKOFF, MILLOT G., TRUFFOT-PERNOT C., VEZIRIS N., BROSSIER F., JARLIER V. Evaluation of a new version of the “RT-TB” triplex real-time PCR assay for the rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich, 2007.
- N. VEZIRIS, IBRAHIM M., TRUFFOT-PERNOT C., ANDRIES K., JARLIER V. R207910 containing regimens display high sterilizing activity in the murine model of tuberculosis. 47th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Chicago. 2007.
- M. IBRAHIM, TRUFFOT-PERNOT C., ANDRIES K., JARLIER V., VEZIRIS N. Sterilizing activity of a Second Line Regimen Including R207910 (TMC207) in Murine Tuberculosis. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Washington DC. 2008.
- M. IBRAHIM, TRUFFOT-PERNOT C., ANDRIES K., JARLIER V., VEZIRIS N. Early and Late Bactericidal Activity of R207910 (TMC207) in Murine Tuberculosis . 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Washington DC. 2008.
- A. AUBRY, SOUGAKOFF W., ROBERT J., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., VEZIRIS N. Molecular versus Classic Methods for Diagnosing Fluoroquinolone Resistance in *M. tuberculosis.* 49th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. San Fransisco, USA, 2009.
- F. BROSSIER, VEZIRIS N., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., SOUGAKOFF W. Investigation of Resistance to the Antituberculous Drug Ethionamide in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis.* 49th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. San Fransisco, USA, 2009.
- A. AUBRY, SOUGAKOFF W., ROBERT J., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., VEZIRIS N. Molecular versus Classic Methods for Diagnosing Fluoroquinolone Resistance in *M. tuberculosis*. 40th Union World Conference onLung Health, Cancún, Mexico, 2009.
- N. VEZIRIS, TRUFFOT C., MAINARDI J., JARLIER V. Imipenem or meropenem plus clavulanate combination improves survival of mice infected with M. tuberculosis. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria, 2010.
- F. BROSSIER,. VEZIRIS N, AUBRY A., JARLIER V., SOUGAKOFF W. Detection by genotype MTBDRsl test of complex resistance mechanisms to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant strains of M*ycobacterium tuberculosis*. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria, 2010.
- F. BROSSIER, VEZIRIS N., JARLIER V., SOUGAKOFF W.. Analysis of the role of genes ethA, ethR, ndh, mshA, inhA and the inhA-promoter in resistance to ethionamide, a second-line antituberculosis drug . 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria, 2010.

- W. SOUGAKOFF, TRUFFOT-PERNOT C., MILLOT G., JARLIER V. Evaluation of a New Triplex Real-Time PCR Assay for the Rapid Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. 46st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco. 2006.
- S. PETRELLA, CAMBAU E., CHAUFFOUR A., ANDRIES K. , JARLIER V .and SOUGAKOFF W. Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria. 46st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco. 2006.
- S. PETRELLA, ZIENTAL-GELUS N., JARLIER V. and SOUGAKOFF W. Crystal structure of the pyrazinamidase PncA from *Mycobacterium tuberculosis*. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington. 2008.
- F. BROSSIER, BOUDINET M., JARLIER V.and Sougakoff W. Structural and biochemical study of new KatG mutations found in clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to isoniazid. 19th ECCMID meeting, Helsinki. 2009.
- E. SEGALA, NEVEJANS A., JARLIER V., SOUGAKOFF W. and PETRELLA S. Binding domain of the TMC207 in subunit C of mycobacterial ATP synthase. 19th ECCMID meeting, Helsinki. 2009.
- F. BROSSIER, PETRELLA S., JARLIER V. and SOUGAKOFF W. Molecular modelling and enzymatic activities of new KatG mutants found in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to isoniazid. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston. 2010.
- S. MATRAT, PETRELLA S., CAMBAU E., SOUGAKOFF W., JARLIER V., AUBRY A. *Mycobacterium leprae* DNA gyrase: expression, purification, inhibition by quinolones and functional analysis of two mutant enzymes. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, poster. 2007.
- S. MATRAT, SOUGAKOFF W., JARLIER V., CAMBAU E., AUBRY A. Role in quinolone resistance of the new DNA gyrase mutations, T73A+A83E in GyrA and R411H in GyrB, found in clinical MDR and XDR strains of *M.tuberculosis.* 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, poster. 2008.
- M. DUPE, MATRAT S., JARLIER V., AUBRY A.. Molecular Basis of Wilder Substrate Spectrum of *Mycobacterium Tuberculosis* DNA Gyrase Function. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, poster. 2010.
- A. PANTEL, BROSSIER F., BASTIAN S., VEZIRIS N., REITTER D., JARLIER V., AUBRY A. Mutations in the GyrB Subunit of DNA Gyrase of *M.tuberculosis* Clinical Isolates: Consequences on Resistance to Fluoroquinolones. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, poster. 2010.

E.5. Conférences sur invitations nationales

Vincent JARLIER

- Nouveaux espoirs thérapeutiques de la tuberculose, 29, RICAI, Paris, 7-8 décembre 2006.
- Epidémiologie et prévention de la tuberculose. 11e Congrès de Pneumologie, Lyon, 2-5 février 2007.
- Les missions du Centre National de Référence. Journée nationale d'information sur la lutte contre la tuberculose. Ministère de la Santé, Paris, 29 mai 2007.
- Tuberculose ultra-résistance : définition, risques et prévention. 8e Journées Nationales d'Infectiologie, Dijon, 13 juin 2007.
- Mycobactéries multirésistantes. 4e Séminaire des CNR, Charenton, 22 novembre 2007.
- Antituberculeux. Nouveaux modes d'action nouveaux mécanismes de résistance, Société Française de Microbiologie, Paris, 5 décembre 2007.
- De l'outil à la décision médicale : outils de diagnostic de la tuberculose. RICAI, Paris, 6-7 décembre 2007.
- Ce que les modèles animaux pourraient apporter à la définition de nouveaux traitements de la tuberculose, 12e Congrès de Pneumologie, Lille, 8-11 février 2008.
- Bases du diagnostic de la tuberculose. Journées Francophones de Pathologie Digestive, Paris, 12 mars 2008.
- Antituberculeux en cours de développement. 3èmes Rencontres Nord-Sud, Paris, 25 novembre 2008.
- Overview on Multi-drug Resistance Tuberculosis. INSERM : new trends in infectious diseases, Lyon, 26-27 novembre 2008.
- Infections à Mycobacterium. 28e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuses, Paris, 4-5 décembre 2008.

- Utilisation des tests interferon gamma (quantiferon) pour la prise de décision médicale individuelle, RICAI, Paris, 3-4 décembre 2009.

Emmanuelle CAMBAU

- Service de Médecine Interne (Pr JC Piette), Groupe Hospitalier PIité-Salpêtrière (octobre 2007) : la tuberculose en France en 2007, nouveautés diagnostiques et thérapeutiques.
- Service de Dermatologie (Pr M Bagot), FMC de la Société Française de Dermatologie (Avril 2008) : Actualités sur mycobactéries.
- Département de Maladies infectieuses, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière : Aspects microbiologiques de l'épidémie d'infections post mésothérapie à *Mycobacterium chelonae,* Octobre 2008
- Service de Médecine Interne (Pr D. Sereni), Hôpital Saint Louis (février 2009) : actualités sur les infections à mycobactéries.
- 29eme Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, décembre 2009 : Biologie de la lèpre aujourd'hui et demain dans les laboratoires de France.
- Service de Médecine Interne, Hôpital Lariboisière (mars 2010) : Tuberculose, actualités diagnostiques et thérapeutiques.
- Rencontre Francilienne 2010 sur la tuberculose (mars 2010): Bactériologie, données sur les résistances et sur l'organisation pratique des services en Ile de France.
- Service de Maladies Infectieuses et tropicales, Hôpital Bichat (avril 2010) : quoi de neuf chez les mycobactéries.
- 15éme colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses, Paris (Mai 2010) : Eau et mycobacterioses.
- Journées nationales d'infectiologie, Montpellier (juin 2010) : Infections à mycobactéries non tuberculeuses ; tourisme chirurgical et procédures médicales invasives
- Journées de Biologie, Paris, novembre 2010 **:** Conditions de vie et Tuberculose: aspects généraux et diagnostic actuel de la maladie, surveillance biologique du traitement,
- 30eme Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, décembre 2010 **:** Les alternatives à l'examen direct,

Laurent RASKINE

- Place de la spectrométrie de masse de type maldi-tof en microbiologie clinique, Nantes, mai 2010
- Microbiologie de routine: du classique à la spectrométrie de masse. Lariboisière, Novembre 2010

Nicolas VEZIRIS

- Prise en charge thérapeutique des infections à Mycobactéries atypiques. Société de pneumologie d'Ile-de-France, Paris, 2006.
- Les infections pulmonaires à Mycobactéries atypiques du sujet transplanté. Groupe Transplantation et Infection, Paris, 2006.
- Tuberculose à bacilles multirésistants. Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, 2006.
- Tuberculose et résistance aux antibiotiques. Service de Médecine Interne, Hôpital Louis Mourier, Colombes, 2006.
- Tuberculose : Nouveaux outils diagnostiques, Les avancées en pneumologie 2006, Paris, 2006.
- La tuberculose : nouveaux traitements. 5ème congrès de l'Union Méditerranéenne de Pathologie thoracique, Montpellier, 2006.
- Lecture critique des nouvelles recommandations sur la tuberculose. Journées Pierre Bourgeois, Paris, 2006.
- Méthodes de diagnostic rapide des résistances aux antituberculeux : quel avenir ? 10ème congrès de pneumologie de langue française, Nice, France 2006.
- Besoins en matière de diagnostic de la tuberculose maladie. Colloque « Performances et intérêt potentiel des nouveaux tests immunologiques in vitro dans le diagnostic de la tuberculose », Paris, 2006.
- « Tuberculose et résistance aux antibiotiques ». Audition Publique « La tuberculose constitue-t-elle un problème majeur de santé publique ? ». Sénat, Paris, février 2007.

- Diagnostic et traitement des mycobactérioses atypiques chez le sujet non VIH, Service de pneumologie, hôpital Tenon, Paris, 2007.
- Tuberculose chimiorésistante en France, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Necker, 2007.
- Diagnostic microbiologique de la maladie tuberculeuse : Quelles techniques de prélèvements pour quelles situations ? 12ème congrès de pneumologie de langue française, Lille, France 2008.
- Mycobactéries atypiques : Epidémiologie des mycobactérioses. 12ème congrès de pneumologie de langue française, Lille, France 2008
- Tuberculose multirésistante, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Avicenne, 2007.
- Prise en charge des tuberculoses résistantes et multirésistantes, Service de Pneumologie, hôpital Ambroise Paré, 2008.
- Nouveautés diagnostiques de la tuberculose, Service de pneumologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 2008.
- Tuberculose : nouveaux outils diagnostiques, Institut Mutualiste Montsouris, 2008.
- Tuberculose : épidémiologie, clinique et thérapeutique. Laboratoire Biomnis, Lyon, 2008.
- Tuberculose à bacilles multirésistants. Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, 2008.
- Epidémiologie et Traitement des infections à Mycobactéries atypiques, GERICCO, 2008.
- Tuberculose à *Mycobacterium tuberculosis* ultra-résistant "XDR" : épidémiologie et prise en charge. 9e Journées Nationales d'Infectiologie Marseille, 2008.
- Actualités de la Tuberculose Pulmonaire. Conférences d'actualité, Service de Pneumologie, Rouen, 2008.
- *Mycobacterium tuberculosis* : résistance, multirésistance, ultrarésitance. Décoder la tuberculose en 2008. Lyon.
- Tuberculose multirésistante. Congres francophone pédiatrique de pneumologie et d'allergologie. Paris, 2008.
- Nouvelles techniques dans le diagnostic des infections à mycobactéries, traitement des mycobactérioses. Service de Médecine Interne, Hôpital de la Croix Saint-Simon, Paris, 2008.
- De la prédiction de l'antibiogramme par la biologie moléculaire. 13ème congrès de pneumologie de langue française, Lille, France 2009.
- Les Nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose. Web Conférence, SPLF, 2009.
- Place de la vaccination dans la lutte contre la tuberculose dans le monde, 2e journée de vaccinologie Jean-Gérard Guillet, Cochin, Paris, 2009.
- Traitement optimal de la tuberculose. Entretiens de Bichat, Paris, 2009.
- New drug research in the treatment of leprosy : results from murine studies. Workshop on Sentinel Surveillance for Drug Resistance in Leprosy, Paris, France, 2009.
- Diagnostic de la résistance aux antituberculeux : Algorithme décisionnel des outils phénotypiques et génotypiques. Outils biologiques au service de la décision individuelle en Tuberculose. Séminaire CNR-InVS, 2009.
- Tuberculose à bacilles multirésistants et ultrarésistants. SMIT, Tourcoing, 2009.
- Tuberculose à bacilles multirésistants et ultrarésistants. HEGP, 2009.
- Actualités des tuberculoses résistantes : diagnostic et traitement. Médecine Interne, Beaujon, 2009.
- La tuberculose fait de la résistance : épidémiologie en France, stratégies thérapeutiques, nouvelles molécules. 11èmes journées nationales d'infectiologie, Montpellier, 2010.

Wladimir SOUGAKOFF

- 11èmes journées de Mycobactériologie de Langue Française. « Etude de la sensibilité des antituberculeux de deuxième ligne par biologie moléculaire ». Bandol, 2009.
- Typologie moléculaire des souches XDR/MDR circulant en France. Congrès de la SFM. Marseille, 2010.
- Tuberculose multirésistante en France : caractérisation moléculaire des souches MDR et étude de cibles pour découvrir de nouveaux antituberculeux. 6eme journée scientifique du CRC (Centre de Recherche des Cordeliers). Paris 2010.

Alexandra AUBRY

- Prélèvements microbiologiques en réanimation : ceux à ne pas faire. 50ème congrès national d'anesthésie et de réanimation organisé par la SFAR, 2008.

E.6. Conférences sur invitations internationales

Vincent Jarlier

- Multi-drug resistant bacteria. Healthcare-related Infections : A step towards making health care safer. Ministry of Health of Koweit. February 27-28, 2006.
- New antimycobacterial antibiotics. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nice, April 2006.
- Multi drug-resistant *M.tuberculosis* : Novel strategies of prevention and treatment. 8th Congress of Chemotherapy and Infection (ECC 8), Budapest, 26-28 October, 2006.
- Tuberculosis : What is new, what is hot.
- Conference of the European Society of Clinical microbiology and Infectious diseases : "Diagnosis and Management of Tuberculosis", Tallinn, June 2006.
- News on the management of MDR and XDR tuberculosis. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, April 2008.
- How rapid diagnostics in microbiology can change the management of patients.18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, April 2008.
- Doctor tests or "bedside-microbiology testing" : can it help in the therapeutic management ? The point of view of the Clinical Microbiologist. Moving Forward in Co-operation-ESCMID, Rome, Italy, October 9-10, 2008.
- Impact of the French national campaigns on antibiotic resistance in bacteria from outpatients. European Workshop "Public Awareness Campaigns on the Prudent Use of Antibiotics", Paris, November 6, 2008.
- Integrating HAI and resistance surveillance, ECDC Conference on surveillance, Stockholm, January 2009.
- The year in Bacteriology, 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Helsinki, May 2009.
- Control of Multidrug resistant bacteria in France, Plenary Meeting, EARSS-ECDC, Strasbourg, 20-21 November 2009.
- TB-new treatment for the 21st century, 20th European Congres of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 10-13 April 2010.
- Tuberculosis and migration, 20th European Congres of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 10-13 April 2010.

Emmanuelle CAMBAU

- ECCMID: "Quinolone resistance and efflux". Avril 2006.
- ESCMID Professional affairs workshop: Why is the workflow in clinical microbiology so slow? Can we get it quicker? Roma, October 2008.
- European Society for Mycobacteriology: Three Dimensional testing of antituberculous susceptibility by the new TB Exist method. Bled Slovenia, juillet 2010.
- 5th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases: multidrug resistance and extensively drug resistant Tuberculosis: current status and future prospects. Taiwan, Septembre 2010.
- 3rd meeting for sentinel surveillance and for drug resistance in leprosy. Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nice,: collection of samples: use of FTA card, skin smears and punch biopsy for PCR; Detection of antibiotic resistance in *Mycobacterium leprae*. Tokyo; Novembre 2010.
- Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases: Detection of antibiotic resistance in *Mycobacterium leprae*. Tokyo, Novembre 2010.

F. Démarche qualité

Guide de bonne exécution des analyses (GBEA)

Le groupe de mycobactériologistes des CHU (« AZAY mycobactéries ») a rédigé un GBEA commun disponible sur le site « azaymycobacteries.free.fr » et sur www.microbes-edu.fr, et accessibles via le site http://CNR-MyRMAmyctb.free.fr. Ce guide comporte les chapitres suivants :
Mode opératoire : Préparation technique, Décontamination des prélèvements, Colorations et Examen microscopique, Culture des mycobactéries sur milieux spécifiques, Identification des mycobactéries par méthodes phénotypiques et génotypiques, Antibiogramme des mycobactéries par méthodes phénotypiques et génotypiques, Amplification génique pour diagnostic.
Procédure : Les mycobactéries, hygiène et sécurité, contrôle de qualité, élimination des déchets, biologie moléculaire, souchothèque
Procédure annexe : Prélèvements

Accréditation

Le CNR-MyRMA s'est inscrit dans la démarche d'accréditation des laboratoires (norme NF EN ISO 15189) par l'intermédiaire des groupes hospitaliers auxquels le laboratoire coordonateur et la laboratoire associé appartiennent, respectivement le Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (AP-HP) et le Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal (AP-HP). Le CNR-MyRMA participe au travers de ses membres à plusieurs groupes de travail mis en place pour l'accréditation de l'ensemble des laboratoires: (1) gestion non conformité, (2) contractualisation prescripteurs/ laboratoires (3) infrastructures et locaux. Ces groupes de travail incluent des membres du CNR-MyRMA et, plus largement, ceux des laboratoires hébergeant le CNR.

Participation du CNR-MyRMA aux contrôles de qualité externe supranationaux

Depuis 2007, l'OMS organise pour les laboratoires nationaux de référence européens un contrôle de qualité externe (CQE) des tests de sensibilité aux antituberculeux pour *M.tuberculosis.* Ce contrôle est organisé tous les 3 ans environ sous la forme d'un lot de 20 souches envoyées par la Health Protection Agency (précédemment Public Health Laboratory Service). Les résultats obtenus par le CNR-MyRMA en 2007 et 2009 étaient de 100% pour isoniazide, rifampicine et éthambutol et 90-100% pour la streptomycine.
Le CNR-MyRMA participe chaque année au programme d'évaluation QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) organisé à titre payant par la Société européenne de Microbiologie Clinique et Maladies Infectieuses (ESCMID) destiné à évaluer la sensibilité et la spécificité des méthodes d'amplification moléculaire utilisées pour la détection de *M.tuberculosis* dans les prélèvem*ents*. Les résultats obtenus par le CNR-MyRMA sont bons.
Le CNR-MyRMA a participé aux deux premiers contrôles de qualité européen de génotypage MIRU-VNTR en 2009 et 2010. Il s'agissait à chaque fois d'une trentaine d'extraits d'ADN de *M.tuberculosis* envoyés par le RIVM de Bilthoven (Pays bas) à analyser en MIRU-VNTR 24. Nos résultats de 2009 sont très satisfaisants. Les résultats de 2010 sont en cours d'analyse au RIVM
Enfin, l'ECDC a organisé pour la 1ère fois en 2010, à travers le réseau de CNR européens ERLN-TB, un contrôle de qualité des laboratoires de référence portant sur l'examen microscopique, l'identification, la mise en culture et l'antibiogramme. Le CNR-MyRMA a participé à ce contrôle pour ces 2 sites (site Pitié-Salpêtrière et site Saint Louis) et a obtenu une certification sur les différents points abordés.

Nouvelles réglementation sur les MOT : cas des souches de *M.tuberculosis* XDR

Le CNR-MyRMA devra se mettre en conformité concernant la nouvelle réglementation relative aux micro-organismes dangereux (décret 2010-736 du 30 juin 2010), dont la liste contient les agents dits « du bioterrorisme » (bactéries de la peste, du charbon….) mais aussi *M.tuberculosis* ultrarésistant (XDR). Cette réglementation est très contraignante et interdit la conservation des prélèvements et souches au-delà de 30 jours sauf à obtenir une autorisation délivrée par l'AFSSAPS après avis de l'ANSSA. La demande d'autorisation s'accompagne d'un dossier très lourd. De plus, les modalités de détention sont drastiques car elles exigent (a) l'utilisation d'un registre spécial coté et paraphé par le maire ou le commissaire de police, ou un système informatique empêchant toute modification et dupliqué sur 2 supports distincts, et (b) de recueillir de nombreuses informations dont la traçabilité complète de chaque mouvement des souches en dehors du lieu de stockage.

Traçabilité

La traçabilité concerne principalement les échanges entre les laboratoires demandeurs et les 2 laboratoires du CNR-MyRMA mais peut aussi concerner les échanges entre le laboratoire coordonateur et le laboratoire associé. Il faudra à l'avenir rédiger des procédures spécifiques à cet effet.

Traçabilité des demandes et des résultats

Les feuilles de demande d'expertise et leurs éventuelles pièces jointes (compte rendu d'un dossier patient, feuille des résultats obtenus dans le laboratoire demandeur) qui jusqu'à maintenant sont achivées telles quelles seront, à l'avenir, saisies et archivées via un scanner spécifique (ScanBac® Ordo) dans le SGL du laboratoire coordonateur. Une copie des demandes transmises au laboratoire associé sera conservée par le laboratoire coordonateur.

La traçabilité des rendus de résultats est établie pour les paramètres suivants : identité des correspondants (biologiste, clinicien, autorité sanitaire), mode de rendu (téléphone, fax, email, courrier), date et heure, résultats intermédiaires rendus en urgence.

Les données sont conservées pendant au moins 5 ans pour les résultats intermédiaires (listes de travail, cahiers de paillasse) et pendant au moins 20 ans pour les résultats définitifs. A l'avenir, une sauvegarde informatique automatisée sera assurée par les services informatiques centraux de l'AP-HP. De plus, des résultats seront exportés au format texte « csv » dans des tables de type Excel conservées dans le système informatique du laboratoire. Les données générées dans l'actuel système de gestion du labotratoire (Molis®, Sysmex) seront archivées, exportées dans un autre système informatique du laboratoire lorsque le nouveau système (GLIMS®, MIPS) sera installé (cf section G ci-après).

Traçabilité des matériels reçus et conservés

Les tubes de conservation des souches, prélèvements ou autres (extrait ADN par exemple) sont numérotées (numérotation spécifique) et classées. A l'avenir, leur traçabilité sera assurée en utilisant le module spécifique du nouveau SGL. Les souches étudiées au laboratoire associé seront aussi conservées au laboratoire coordonateur selon les conditions indiquées dans le chapitre « Collection de souches »

Traçabilité des réunions de travail

Les réunions du « Groupe thérapeutique » et les réunions mensuelles des membres du CNR-MyRMA sont tracées par une feuille de présence et un compte rendu écrit. Si le projet de visio-conférences du « Groupe thérapeutique » abouti, celles-ci seront enregistrées (cf projet).

G. Infrastructure informatique

Recueil des données des cas donnant lieu à une expertise microbiologique

A partir de 2012, les 2 laboratoires du CNR-MyRMA seront équipés du même système informatique de gestion de laboratoire ou SGL (système GLIMS de la société MIPS) avec un schéma commun pour les analyses de mycobactériologie et une base commune hébergée par l'AP-HP. Une requête sera faite auprès du responsable institutionnel informatique de l'AP-HP afin de pouvoir partager les données de la base consacrée aux activités du CNR-MyRMA.

La structure des fichiers patients dans le SGL GLIMS permettra de réunir dans un même dossier toutes les informations concernant le patient pour lequel le CNR-MyRMA travaille : nom et coordonnées du laboratoire demandeur, nom et coordonnées du patient, type de demande (prélèvement, souche), détail de la demande (scan de la lettre ou fiche, codage de la demande : identification, tests de sensibilité, génotypage), résultats : identification détaillée (résultats des tests phénotypiques et génotypiques), tests de sensibilité phénotypiques (résultats bruts et interprétés, CMI…) et génotypiques (mutations), génotypage (code MIRU). Le SGL permettra les exploitations croisées de ces informations, éventuellement après exportation dans un logiciel adéquat.

Traitement des données des enquêtes de surveillance

La base des données des enquêtes du CNR-MyRMA est conservée dans un fichier EPIDATA déclaré à la CNIL. Les supports papier des fiches de réponse aux enquêtes sont conservés au CNR-MyRMA sans limite de durée pour le moment.

Le site internet **http://cnrmyctb.free.fr** est maintenant utilisé pour les opérations de recueil des données lors des enquêtes annuelles du réseau du CNR-MyRMA sur la tuberculose à bacilles MDR et sur la méningite tuberculeuse via un questionnaire en ligne, et ce en complément du questionnaire sur papier habituel. Près d'un quart des laboratoires utilisent maintenant notre site internet pour participer aux enquêtes.

Nous projetons de développer de manière plus précise les pages consacrées aux activités d'expertise du CNR-MyRMA afin d'améliorer la lisibilité de nos travaux (tableaux de données statistiques sur les espèces identifiées, les profils de résistance aux antimycobactériens, les alertes…) et le service rendu aux collègues.

La mise en place d'un outil de statistique des fréquentations du site est aussi en projet.

Transmission des données vers l'InVS

Au-delà des rapports annuels, le CNR-MyRMA :
-informe l'InVS (Didier Che, Delphine Antoine) lorsqu'un évènement inhabituel se produit (cf section « Alertes »)
- répond aux demandes de l'InVS concernant des aspects spécifiques (cf section « Alertes).

Annexes

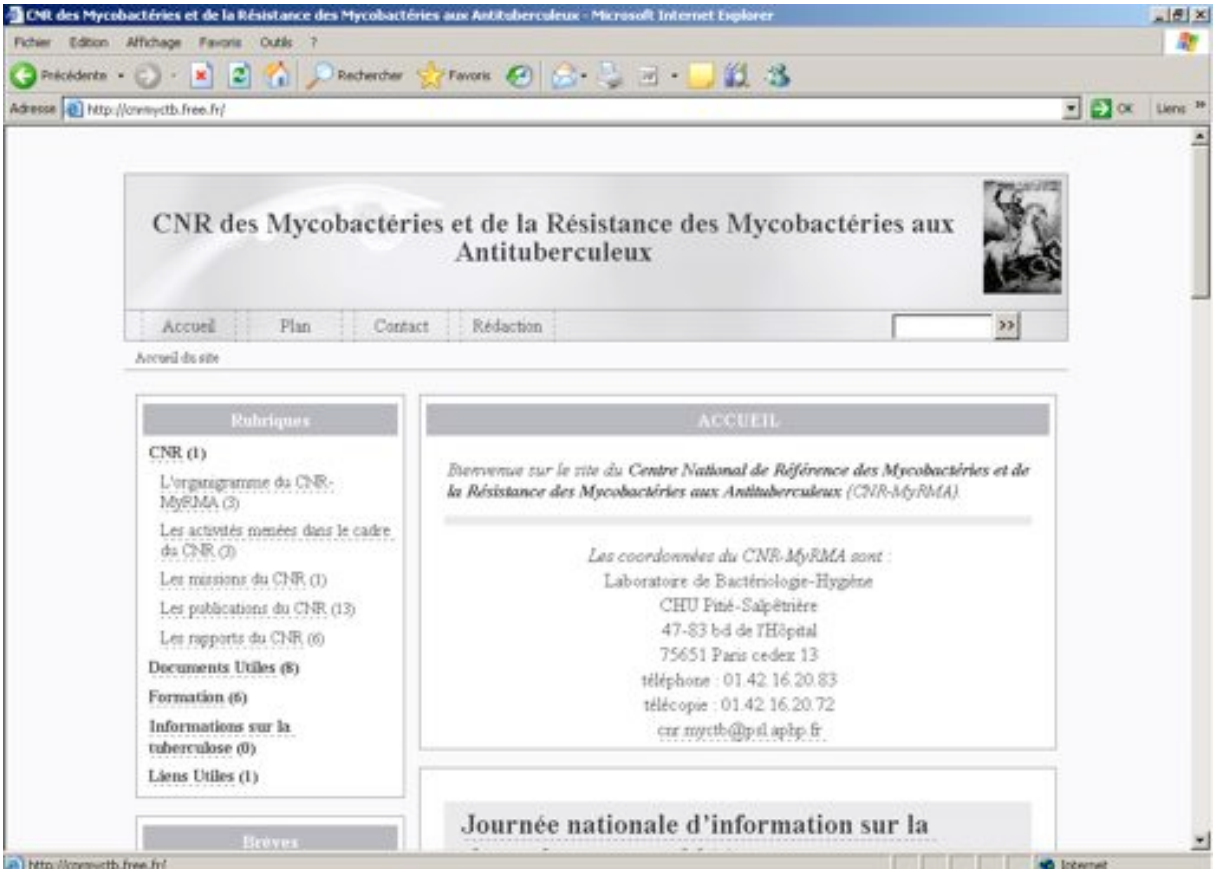
Annexe 1 : page d'accueil du site Internet du CNR-MyRMA : http://cnrmyctb.free.fr

Annexe 2 : page d'accueil du site internet pour l'enquête de surveillance de la tuberculose à bacilles multi-résistants

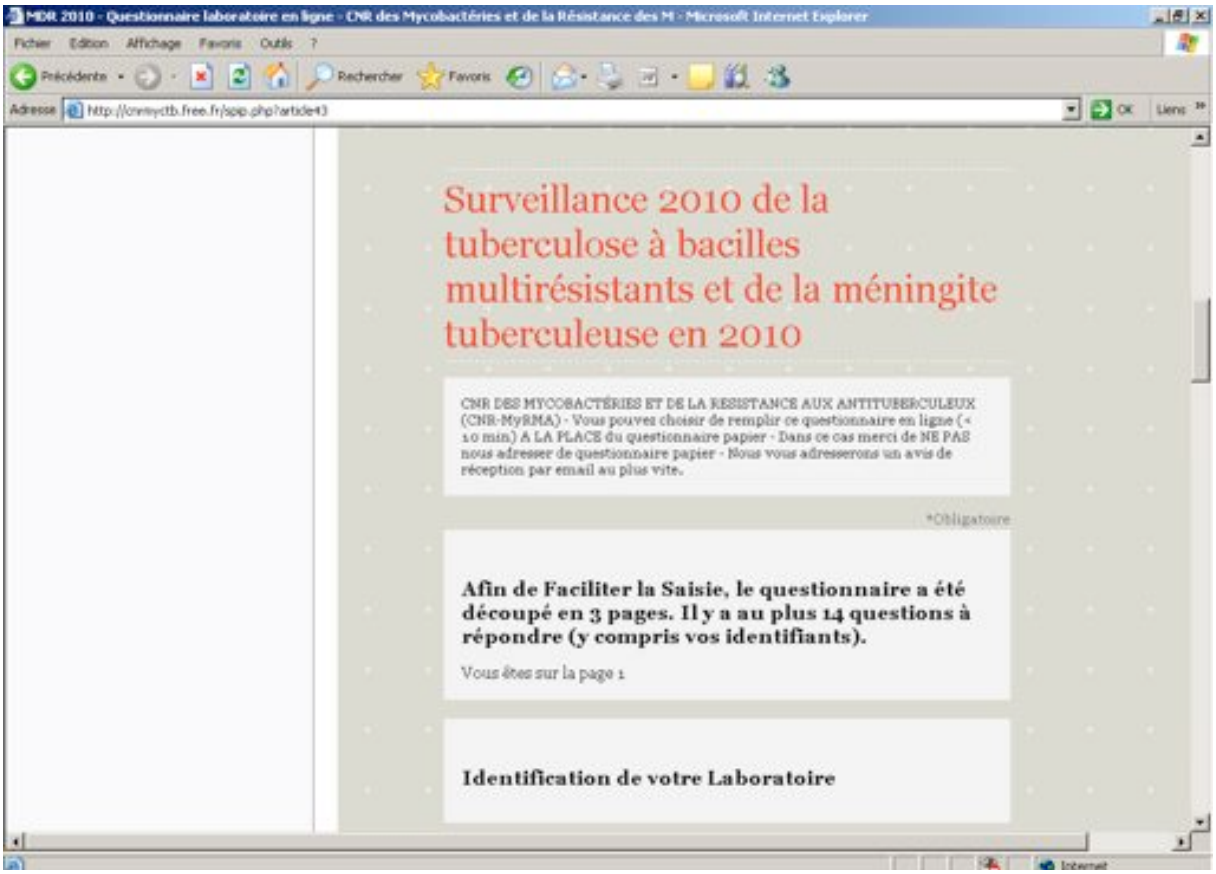
Annexe 3 : fiche de l'enquête de surveillance de la tuberculose à bacilles multi-résistants

Annexe 4 : Fiche accompagnant l'envoi de souches ou prélèvements pour expertise

Annexe 1 : page d'accueil du site Internet du CNR-MyRMA : http://cnrmyctb.free.fr



Annexe 2 : page d'accueil du site internet pour l'enquête de surveillance de la tuberculose à bacilles multi-résistants



Annexe 3 : fiche de l'enquête de surveillance de la tuberculose à bacilles multi-résistants

Fiche 1 — Fiche 1

Centre National de Référence
de la Résistance des Mycobactéries
aux Antituberculeux

2010

Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants en 2010
[résistants à la rifampicine (RMP) et à l'isoniazide (INH)]
et à bacilles résistants à RMP mais sensibles à l'INH ["monorésistants RMP"]
et de la méningite tuberculeuse en 2010

Laboratoire
(cachet ou adresse)

Téléphone :
E-mail :

1. Nombre de malades pour lesquels il y a eu au moins une culture positive à bacille tuberculeux (complexe tuberculosis) dans votre laboratoire (prélèvement effectué entre le 01.01.2010 et le 31.12.2010)

Nombre TOTAL de malades porteurs de bacilles tuberculeux isolés dans votre laboratoire en 2010	Dont, nombre de malades porteurs de bacilles		MENINGITE tuberculeuse ou infection intracérébrale prouvée (culture + à M. tuberculosis)	
	multirésistants (RMP + INH) en 2010	résistants à RMP mais sensibles à INH en 2010	Tous âges confondus	Chez les enfants < 5 ans

2. Techniques utilisées pour le diagnostic de la tuberculose dans votre laboratoire en 2010 :

- Examen microscopique
- Culture
- Identification
- Antibiogramme
  - Méthode des proportions
  - Système Bactec
  - MGIT
  - Bandelette MTB-DR Hain
  - Cepheid Xpert MTB/RIF
  - Autre Méthode

3. Utilisez vous dans certaines circonstances une technique d'amplification pour détecter directement M. tuberculosis dans les prélèvements ? NON ☐ OUI ☐

4. Réalisez vous des antibiogrammes pour des MYCOBACTERIES ATYPIQUES ? NON ☐ OUI ☐
Si OUI, par quelle méthode ? ___ ___ ___ ___ ___

5. Si vous n'effectuez pas les antibiogrammes dans votre laboratoire, quel est le nom du laboratoire auquel vous adressez les souches ? _____

NOM du microbiologiste ayant rempli la fiche : _____

Signature — Date :

Fiche 1 - 2010 — Laboratoire de Bactériologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière
47-83 boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13 — Fiche 1

Annexe 4 : Fiche accompagnant l'envoi de souches ou prélèvements pour expertise

Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène (Pr Vincent Jarlier)
CHU Pitié-Salpêtrière
47-83 bd de l'Hôpital – 75651 Paris cedex 13
Tél : 01 42 16 25 83 Fax : 01 42 16 21 27 E-mail : cnr.myrma@psl.aphp.fr

FICHE DE RENSEIGNEMENTS A JOINDRE A TOUT ENVOI AU CNR

EXPEDITEUR	EXPEDITEUR (Tampon)	ZONE RESERVEE au CNR
Nom : Prénom : Adresse : Tél : Tél : e-mail :		

Nom du médecin traitant : Tél :
Adresse :

RENSEIGNEMENTS ADMINISTRATIFS CONCERNANT LE MALADE

NOM : Prénom : ETIQUETTE DU MALADE
Sexe : M – F Date de Naissance :
Pays de Naissance :
Date d'arrivée en France :

MOTIF DE L'ENVOI (joindre courrier si besoin)

Identification	Antibiogramme phénotypique	Antibiogramme génotypique
☐ Au sein du complexe tuberculeux ☐ Myc. atypique	☐ Vitesse nutritionnelle ☐ Vitesse N. aurantiaca ☐ Vitesse N. autre (préciser) ☐ Myc. atypique	☐ Diagnostic moléculaire de la résistance à streptomycine ☐ Diagnostic moléculaire de la résistance à autre antibiotique (préciser) :

☐ Génotypage (« empreintes digitales génétiques ») ☐ Autre (préciser)

RENSEIGNEMENTS INDISPENSABLES

Nature de l'envoi : ☐ souche ☐ prélèvement

- Si souche : Nature du prélèvement d'origine : Date : Microscopie : neg / pos ( ) BAAR/champ
Date positivité culture : en milieu liquide (délai positivité : jours) / en milieu solide (N colonies/tube :)
Identification :
- Si prélèvement : Nature : Date : Microscopie : neg / pos ( ) BAAR/champ
Prélèvement, décontaminé : O / N Inoculé : O / N

Antécédents :

Immunodépression : oui / non, Nature : VIH (CD4), autre : Autre comorbidité :

Traitements antituberculeux actuels :

Si mycobactériose respiratoire, préciser : 1) autres prélèvements positifs (nombre, dates, BAAR+, délai positivité, N colonies/tube) :

2) signes respiratoires cliniques et radiologiques :

Antécédent de tuberculose ou de mycobactériose : oui / non, si oui espèce : date :
Localisation : Traitement :

Si génotypage, préciser identités et dates de prélèvement des souches à comparer (joindre un courrier pour préciser le contexte) :

Date : Nom : Signature :