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

Laboratoire coordonnateur
Fédération de Bactériologie - Hygiène
AP-HP.Sorbonne Université
PARIS
Responsable : Pr Jérôme ROBERT

Laboratoire associé
Service de Mycobactériologie spécialisée et de Référence
GHU Nord Université Paris Cité, site Bichat
PARIS
Responsable : Pr Emmanuelle CAMBAU

Rapport 2021
Bilan extrait de la demande de renouvellement
Juin 2022

Tables des matières

1 Descriptif du CNR-MyRMA 3
1.1 Organisation 3
1.2 Organigramme du CNR-MyRMA 4
1.3 Réseaux partenaires 4
1.4 Unités de recherche labellisées 5
2 Activités scientifiques et techniques : bilan 2017-2021 5
2.1 Activités d'expertise microbiologique 5
2.2 Conseil aux professionnels et aux autorités de santé 11
2.3 Contribution à la surveillance épidémiologique 14
2.4 Contribution à l'alerte 18
3 Liste des publications et communications 2020-2021 18
3.1 Communications Nationales (sans invitation) 18
3.2 Communications Internationales (sans invitation) 19
3.3 Communications Nationales (sur invitation) 20
3.4 Communications Internationales (sur invitation) 21
3.5 Organisation de congrès 21
4 PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2023-2027 22
4.1 Activités d'expertise 22
4.2 Activités de conseil, formation et information 30
4.3 Contribution à la surveillance épidémiologique 35
4.4 Contribution à l'alerte 41

Index des tableaux et figures

TABLEAU 1 - BILAN DE LA SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-LEPREUX CHEZ LES PATIENTS DIAGNOSTIQUES EN FRANCE (2001-2021) 11

FIGURE 1 - ORGANIGRAMME DU CNR-MYRMA 4
FIGURE 2 - LOGIGRAMME DU CNR-MYRMA POUR LA PRISE EN CHARGE DES PRELEVEMENTS ET SOUCHES SUSPECTS D'HEBERGER DES BACILLES RESISTANTS A LA RIFAMPICINE 25
FIGURE 3 - LOGIGRAMME DU CNR-MYRMA POUR LA PRISE EN CHARGE DES PRELEVEMENTS ET SOUCHES SUSPECTS D'HEBERGER DES BACILLES RESISTANTS A UN AUTRE ANTIBIOTIQUE QUE RIFAMPICINE 26
FIGURE 4 - LOGIGRAMME DU CNR-MYRMA POUR L'IDENTIFICATION ET DE DETERMINATION DE LA RESISTANCE DES MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES 27
FIGURE 5 - LOGIGRAMME DU CNR-MYRMA POUR LA PRISE EN CHARGE DES PRELEVEMENTS POUR SUSPICION DE LEPRE 28
FIGURE 6 - ORGANISATION DE L'APPUI THERAPEUTIQUE PAR LE CNR-MYRMA DANS LE CADRE DE RCP 32
FIGURE 7 - LOGIGRAMME DU CNR-MYRMA POUR LE TYPAGE MOLECULAIRE DES SOUCHES DE M.TUBERCULOSIS 38
FIGURE 8 - LOGIGRAMME DU CNR-MYRMA POUR LE TYPAGE MOLECULAIRE DES SOUCHES DE MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES 39

1 Descriptif du CNR-MyRMA

1.1 Organisation

L'organisation, fonctionnelle depuis trois mandatures, repose sur deux laboratoires de bactériologie médicale hospitalo-universitaires :

- **un laboratoire coordonnateur** : Fédération de **Bactériologie-Hygiène Hospitalière, APHP.Sorbonne Université**, responsable **Pr Jérôme ROBERT,** qui résulte du regroupement des laboratoires de Bactériologie de la Pitié-Salpêtrière (Pr Jérôme ROBERT) et des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien (Pr Nicolas VEZIRIS) ;

- **un laboratoire associé** : Service de mycobactériologie spécialisée et de référence, GHU Nord Université Paris Cité, **site Bichat**, responsable **Pr Emmanuelle CAMBAU,** par suite du transfert sur ce site du laboratoire associé situé précédemment dans l'hôpital Lariboisière.

L'expertise de ces deux laboratoires est reconnue nationalement et internationalement. **Chacun maitrise les techniques** phénotypiques et génotypiques en mycobactériologie médicale (tuberculose, lèpre, infections à mycobactéries non tuberculeuses), est équipé d'un **laboratoire de sécurité L3** permettant la manipulation de *M. tuberculosis et M. leprae* et bénéficie d'un personnel compétent en mycobactériologie**, ce qui permet de se suppléer mutuellement et d'assurer la continuité des activités d'expertise** (ex. maintenance d'un des 2 secteurs L3, problème technique, déficit momentané en personnel, congés…)**.**
Ces deux laboratoires mettent aussi en commun des centres d'intérêt complémentaires :

- **laboratoire coordonnateur AP-HP.Sorbonne Université** : aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour *M. tuberculosis complex* ; mycobactériologie des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) à croissance lente, surveillance épidémiologique des infections à travers les réseaux partenaires ; coordination des conseils thérapeutiques pour les infections tuberculeuses difficiles à traiter (ex. tuberculose MDR…).
- **laboratoire associé Service de mycobactériologie spécialisée Bichat :** aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour les MNT à croissance rapide et *M. leprae* ; mycobactériologie environnementale ; conseils et alertes pour les infections liées aux soins ou à un réservoir environnemental ; tests d'infection tuberculeuse ; coordination des conseils thérapeutiques pour les infections à MNT et la lèpre.

Cette complémentarité permet de répondre à l'ensemble des missions du CNR-MyRMA et d'optimiser (i) l'aide apportée aux collègues microbiologistes et cliniciens, (ii) les interactions avec les autorités sanitaires (Santé Publique France, DGS, ARS) et les CLAT et (iii) le développement de notre expertise nationale et internationale.

1.2 Organigramme du CNR-MyRMA

Figure 1 - Organigramme du CNR-MyRMA

Les membres médicaux et scientifiques du CNR-MyRMA sont

- Alexandra Aubry (SU)
- Zeina Awad (Bch)
- Isabelle Bonnet (SU)
- Emmanuelle Cambau (Bch)
- Lorenzo Guglielmetti (SU)
- Florence Morel (SU)
- Faiza Mougari (Bch)
- Jérôme Robert (SU)
- Christophe Sola (Bch)
- Nicolas Veziris (SU)

Avec l'aide de la cadre technique Nathalie Bacon (SU) et l'ensemble du personnel technique (https://cnrmyrma.fr/personnel-du-cnr-myrma/)

1.3 Réseaux partenaires

Le CNR-MyRMA s'appuie sur 2 réseaux partenaires

Le réseau Azay-Mycobactéries

Depuis 1995, le CNR appuie ses activités de surveillance de la **résistance primaire et secondaire aux antibiotiques de *Mycobacterium tuberculosis* complex** sur la collaboration volontaire de 35 laboratoires recouvrant l'activité de 44 centres **hospitalo-universitaires** couvrant toutes les régions métropolitaines (sauf la Corse et les DOM). La surveillance assurée à travers ce réseau est standardisée, en particulier pour ce qui est du recueil des informations cliniques et des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques de première ligne. La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de nombreux travaux publiés. **Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~1.800 cas de tuberculose /an.**

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, avec l'aide de **l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie (140 en 2020)** une surveillance annuelle exhaustive du nombre de cas de **tuberculose bactériologiquement confirmée** (culture positive) et du nombre de cas avec une souche résistante à l'isoniazide et à la rifampicine **(cas « multirésistants » ou MDR**).
Ce réseau est aussi mis à contribution pour surveiller certaines formes particulières de tuberculoses (**méningites**...).
Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~4.200 cas de tuberculoses /an.

1.4 Unités de recherche labellisées

Le CNR-MyRMA est adossé à 2 unités de recherche labellisées

Laboratoire coordonnateur (AP-HP.Sorbonne Université)
Equipe EDIRA « Mécanismes d'émergence et de diffusion de la multirésistance chez les Mycobactéries et les entérobactéries », intégrée à l'unité de recherche labéllisée par l'INSERM et Sorbonne Université U1135 « Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (Cimi-Paris) », dirigée par le Pr Alexandra AUBRY.

Laboratoire associé (Site Bichat)
UMR1137 INSERM- Universités Paris Cité et Paris Nord (ex P13) : IAME (infection, antimicrobiens, modélisation, évolution), dirigée par le Pr Erik DENAMUR (contrat 2020-2024 en cours).

2 Activités scientifiques et techniques : bilan 2017-2021

2.1 Activités d'expertise microbiologique

2.1.1 Développement et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic

Entre 2017 et 2021 nous avons **développé et mis au point des techniques non commercialisées**, qui ont été ensuite utilisés comme activités d'expertise au CNR-MyRMA :

- évaluation du milieu optimal pour l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries non tuberculeuses (NTM) du complexe. *M. avium* (Jaffre J. et al, Frontiers Microbiol, 2020)
- étude de la résistance de *M. leprae* aux antibiotiques et détection de *M. leprae* par PCR temps réel quantitative (Avanzi et al, Front Microbiol, 2020 ; Chauffour et al, CMI, 2018 ; Cambau et al, CMI, 2018 ; Machado et al, Frontiers Microbiol, 2018)
- mise en place du séquençage génomique complet de *M. leprae* (Avanzi et al. Front Microbiol 2020)
- mise en place du séquençage génomique complet de mycobactéries non tuberculeuses (*M. abscessus, M. chelonae, M. chimaera, M. fortuitum, M. marinum*) (Lecorche et al. Open forum in infectious disease 2021, Daniau et al. Emerging infectious diseases 2022)
- mise en place du séquençage génomique complet de *M. tuberculosis* en routine (Andres et al, 2019) - mise de place de détermination de la sensibilité aux nouveaux antituberculeux (bédaquilne, linézolide, délamanide et prétomanide) par méthodes génotypiques et phénotypiques

- Développement et évaluation du nouveau kit GenoType NTM-DR pour la détection de la résistance aux antibiotiques des mycobactéries non tuberculeuses (Mougari, J Antimicrob Chemother 2017)
- Détermination et mise en place d'une méthode de référence EUCAST pour les mesures de CMI des antituberculeux vis à vis de *Mycobacterium tuberculosis* complex (Schon T et al. CMI 2020a, Schon T et al. CMI 2020b, Schon T et al. CMI 2021)
- Développement et évaluation du test VIDAS® TB-IGRA (biomérieux), nouveau test diagnostic de l'infection tuberculeuse réalisable en unidose et automatisé et sans conditions strictes pré-analytiques (articles soumis pour publication Diagbouga et al.; Goletti et al.).

Entre 2017 et 2021, nous avons aussi **développé des stratégies d'utilisation des tests biologiques** commercialisés, permettant ensuite leur transfert aux autres laboratoires :

- Diagnostic moléculaire rapide de la tuberculose et de sa résistance à la rifampicine et à l'isoniazide grâce au test automatisé MDR/MTB ELITe MGB® (OK, Antibiotics, 2021).
- Evaluation d'une approche combinant l'automate GeneLEADVIII et le kit Deeplex MycTB® pour détecter en 8 jours la résistance à 13 antituberculeux et la transmission du complexe Mycobacterium tuberculosis directement à partir de prélèvements cliniques (Bonnet et al, Front Cell Infect Microbiol, 2021).
- Evaluation de la trousse quantiféron Gold plus vs Gold (qiagen) pour les sujets contacts lors d'enquête autour de cas (Benmansour H et al. SFM 2019)

-évaluation des performances du kit DiaSorin LIAISON® QuantiFERON-TB Gold Plus_par méthode automatisée sur Liaison XL (chimioluminiscence) vs QuantiFERON-TB Gold Plus (Qiagen) par Elisa sur Dynex DS2 (Benmansour et al. JMLF 2021).

2.1.2 Activités d'expertise sur les souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA

Le nombre de **souches** (ou prélèvements contenant des bacilles, permettant de pratiquer des tests rapides avant obtention des cultures) reçues au CNR-MyRMA depuis 2017 **est de l'ordre de 1200-1400 par an** pour identification et/ou étude génotypique et phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques et/ou génotypage à visée épidémiologique de *M. tuberculosis*, mycobactéries non tuberculeuses ou *M. leprae*. Les souches et prélèvements proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et DOM-TOM (laboratoires de CHU, autres hôpitaux, LABM...).
On peut noter une baisse d'activité en 2020 et, un peu moins marquée, en 2021 due probablement à la crise Covid-19. Malgré cette légère baisse, l'activité de cette mandature reste au moins aussi importante que lors de la mandature précédente.

En résumé :
- l'activité de la dernière mandature est identique à la précédente pour les identifications et les tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques
- elle a augmenté de 30% pour les tests génotypiques de résistance et le nombre de gènes analysés. - l'augmentation est de 20% pour les tests moléculaires de comparaison de souches (dont 400% pour les souches de MNT)
- l'analyse WGS a été introduite au début de cette mandature en 2017 pour *M. tuberculosis* et les MNT et elle concerne actuellement plus de 200 souches par an
- après avoir beaucoup augmenté entre 2012 et 2017, le nombre de biopsies soumises à la détection de *M. leprae* est à peu près stable depuis 2017 autour d'une centaine car nous recevons maintenant toutes les demandes de métropole et une partie de celles des DOM-TOM où il n'y a pas ou plus de laboratoire expert en lèpre. Le nombre de cas de lèpre avec une microbiologie positive (cas multibacillaire ou lépromateux) est stable autour d'une trentaine de cas par an venant pour un peu plus de la moitié (55-65%) des DOM-TOM et un peu moins de la moitié des migrants en métropole.

2.1.3 Espèces identifiées

La distribution des espèces au sein *de M. tuberculosis* complex est restée stable depuis 2012. Sur les cinq dernières années, les proportions sont de 91% *M. tuberculosis*, 2,2% *M. bovis*, 1,7% *M. bovis var BCG* et 4,5% *M. africanum*.

La distribution des **principales espèces de mycobactéries non tuberculeuses d'intérêt médical est restée globalement stable** depuis 2012 : environ 40% *M. avium complex (dont la moitié M. avium, ¼ M. intracellulare et ¼ M. chimaera*), *environ* 20% *M. abscessus,* 10% *M. xenopi,* 5% *M. chelonae,* 5% *M. fortuitum* 3% *M. kansasii*. *Le nombre de souches de M. chelonae a doublé en 2021 par rapport aux années précédentes.*

Il faut noter que **5 à 10%** des souches de mycobactéries non tuberculeuses appartiennent à des espèces **rares ou récemment décrites, ce qui demande un travail minutieux d'identification.**

Enfin, dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis la suspension de l'obligation vaccinale par le BCG en 2007, nous comptabilisons les souches de mycobactéries atypiques isolées **d'adénites chez des enfants de moins de 5 ans**. Leur nombre, qui avait nettement augmenté de 2006 à 2013 (3 à 19 cas), a baissé depuis (1 à 6 cas par an depuis 2014).

2.1.4 Résultats des tests phénotypiques de sensibilité des souches de M. tuberculosis complex

La proportion de **souches multisensibles reçues au CNR-MyRMA est restée très basse (~1/4)** ce qui reflète notre volonté de **nous concentrer sur l'étude des souches résistantes** et d'éviter de travailler sur des souches sensibles qui peuvent plus facilement être prises en charge par les autres laboratoires de mycobactériologie.

SOUCHES MDR ET XDR

Le nombre moyen de **souches MDR** (résistance à isoniazide **et** rifampicine) reçues au CNR-MyRMA, qui était resté à peu près stable jusqu'en 2010 autour d'environ 50/an, a augmenté en 2011 (n=69), en 2012 (n=92), **s'est stabilisé ensuite autour d'une centaine par an puis à 50-70 cas/an depuis la pandémie de covid-19.**
La définition des souches XDR a changé en 2021. Selon l'ancienne définition, qui est celle reconnue par l'ANSM dans la catégorisation MOT (MDR + résistance aux aminosides **et** aux fluoroquinolones), le nombre de souches **XDR**, qui avait augmenté de 6 en 2010, à 17 en 2012 et 26 en 2014, est redescendu à **~**10/an depuis 2015, pour chuter à 1 cas en 2021. Selon la nouvelle définition des souches XDR de l'OMS (MDR + résistance aux fluoroquinolones et à la bédaquiline et/ou le linézolide), le nombre de souches XDR est inférieur à 5 /an.
Selon la nouvelle définition 2021 des souches pré-XDR de l'OMS, (MDR résistantes aux fluoroquinolones), le nombre de souches pré-XDR **a augmenté, en passant de** 10 en 2010 à 20-43 de 2012 à 2015 pour redescendre ensuite à une moyenne de 10-15 souches.

Ces variations sont principalement liées aux patients porteurs de souches MDR ou XDR originaires de l'ex URSS (Russie, Tchéchénie, Arménie, Ukraine, Géorgie) et de Roumanie, en général arrivés récemment en France.

L'évolution du nombre de souches MDR-XDR reçues, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA (cf. section « Surveillance ») montre que **le CNR-MyRMA reçoit la quasitotalité des souches MDR de France ce qui permet de mener des études phénotypique et génotypique exhaustives.**

SENSIBILITE AUX ANTITUBERCULEUX DE 2EME LIGNE DES SOUCHES MDR

Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient élevées : streptomycine 70-80%, éthambutol 50-70%, pyrazinamide 40-65%, éthionamide 60-90%, cyclosérine 10-50%, PAS 5-25% et, pour les antituberculeux qui entrent dans l'ancienne définition de l'ultrarésistance (XDR),

au moins un aminoside (kanamycine, amikacine, capréomycine) 10-40%, fluoroquinolones 20-40%. Pour les antituberculeux faisant partie de la nouvelle définitions OMS 2021 des souches XDR, outre les fluoroquinolones, les proportions de souches MDR résistantes phénotypiquement au linézolide variaient de 0 à 4% (2010-2021), et de 0 à 6% pour la bédaquiline (2014-2021).
Il est donc à noter que, de façon inquiétante, les premières souches MDR résistantes aussi aux nouveaux antituberculeux, ont été isolées ces dernières années en France pour le linezolide et la bédaquiline.
Pour le délamanide, une souche a été détectée résistante en 2020, avec une mutation W88stop dans le gène *ddn* qui a été associée à la résistance au délamanide.

SENSIBILITE AUX ANTITUBERCULEUX DE 2EME LIGNE DES SOUCHES NON MDR

Des souches reçues **dans un contexte autre que la multirésistance** sont testées pour leur sensibilité aux antituberculeux de 2ème ligne dans certaines situations : suspicion initiale de multirésistance non confirmée, effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, mono-résistance à la rifampicine…
La résistance aux antituberculeux de 2ème ligne est rare dans ces situations : 0-3% à l'amikacine, 1-2% aux fluoroquinolones.

Evolution 2006-2021 de la distribution par pays de naissance des patients porteurs des souches MDR reçues au CNR-MyRMA

Les nombres de souches MDR de patients nés dans les pays d'Afrique hors Maghreb, dans les pays d'Asie et dans les pays d'Amérique sont restés stables. En revanche il faut noter :
- la très nette diminution du nombre de souches MDR de patients nés dans les pays d'ex-URSS et d'Europe de l'Est ces deux dernières années (7 à 12 cas) après une période de forte augmentation de 2012-2013 (n~50/an) à 2014 (n=60).
- La diminution et la stabilisation du nombre de souches MDR issues de patients nés en France depuis 2016 (15/an en moyenne depuis, 5 en 2021), après une augmentation inquiétante constatée en 2015 (23 cas).

2.1.5 Contribution à l'étude des mécanismes de résistance de M. tuberculosis complex

De très nombreux gènes de résistance sont détectés et étudiés dans les souches MDR/XDR ou suspectes de l'être, avec une augmentation importante résultant de la mise en place des techniques Deeplex Myc-TB® en 2019 et du séquençage du génome complet (WGS) dès 2018. Avec l'ensemble des techniques génotypiques réalisées, les gènes de résistance étudiés sont : *rpoB, katG, inhA, gyrA, gyrB, pncA, rrs, gid, rpsL, eis, tlyA, embB,* région intergénique *embC/A, ethA, ethR,* région intergénique *ethAethR, atpE, Rv0678, rrl, rplC, fgd1, fbiC, fbiA, fbiB et ddn.*
La technique Deeplex Myc-TB®, grâce aux très grandes profondeurs de séquençage qu'elle permet d'obtenir, a notamment permis d'**optimiser la recherche de variants minoritaires** (avec un seuil de détection de 3%).
Le WGS permet quant à lui d'avoir des **données exhaustives**, la contrepartie étant la difficulté d'interprétation pour les mutations non encore décrites (dans les databases de mutations de résistance, telles que PhyResSE ou encore TB-profiler, ou dans les publications). Cette **complexification dans l'interprétation des résultats** nécessite que le rendu du WGS soit réalisé au sein d'un centre expert tel que le CNR, avec un important travail de veille bibliographique.
Un pas vers la standardisation internationale de l'interprétation des mutations a été amorcé tout récemment avec la **publication en 2021 du catalogue des mutations de l'OMS**. Une nouvelle version implémentée en avril 2022 de l'algorithme d'interprétation de la technique Deeplex Myc-TB® intègre les mutations issues de ce catalogue. Nous avons également intégré ces dernières à nos deux pipelines d'analyse des données issues du WGS. Enfin, le WGS est le seul à permettre de rechercher des mutations impliquées dans la **résistance pour les antituberculeux les plus récents**, le délamanide et le prétomanide. Néanmoins, les connaissances encore très parcellaires sur les gènes/mutations impliquées nécessite un important travail de corrélation génotype/phénotype, en interaction directe avec les travaux de recherche actuellement menés/en prévision au CNR.
La synthèse des résultats obtenus pour 2017-2021 est la suivante :

CNR-MyRMA
Rapport d'activité 2021 (extrait de la demande de renouvellement 2023-2027)

ANTITUBERCULEUX DE 1ERE LIGNE

- Prédominance (~2/3) de la mutation S450L (numérotation de *M. tuberculosis*) du gène *rpoB* chez les souches résistantes à la rifampicine. Il est également à noter une progression ces deux dernières années des mutations associées à un bas niveau de résistance à la rifampicine, telles que D435Y et L452P (16% des mutations détectées dans *rpoB* en 2021). Ces mutations sont notamment détectées grâce à l'apport du WGS et du Deeplex Myc-TB®.
- Prédominance **chez les souches résistantes à l'isoniazide** de la mutation **S315T dans le gène *katG*** trouvée de façon isolée (~2/3) et seulement ~20% de mutations retrouvées isolées dans le promoteur du gène *inhA*. Les **mutations dans KatG autres que S315T** représentent moins de 10% du total des mutations détectées (ces mutations sont difficiles à interpréter).
- Prédominance des mutations dans le gène ***embB*** (~70%), **chez les souches résistantes à l'éthambutol** en majorité M306V et M306I. Les codons 406 et 497 sont parfois aussi impliqués, les autres étant très rares. Le séquençage systématique de la région intergénique entre *embC et embA* depuis 2017 a permis d'améliorer le diagnostic génotypique de la résistance à l'éthambutol, une dizaine de souches en moyenne par an ayant une mutation impliquée dans la résistance dans cette région (dont 5 en 2021 qui n'avaient pas de mutation détectée dans *embB*).
- Très grande diversité des mutations observées dans *pncA* chez les souches résistantes au pyrazinamide, tant en nature (substitution, insertions, délétions, mutations frameshift...) qu'en position sur la protéine. Cette caractéristique rend la prédiction de l'impact des mutations sur la résistance au pyrazinamide assez complexe.

ANTITUBERCULEUX DE SECONDE LIGNE

- Très nette prédominance des mutations dans le gène ***gyrA*** (~80%) **chez les souches résistantes aux fluoroquinolones**, au sein desquelles les codons dominants sont 94 (~80%) et 90 (~15%), et ~20% de **mutations dans *gyrB*.**
- Les souches phénotypiquement résistantes aux fluoroquinolones sans mutation des gènes *gyrA* ou *gyrB* sont exceptionnelles (<1%) ce qui confirme que la recherche de mutations dans ces gènes est une excellente approche rapide de détection de la résistance aux fluoroquinolones, antituberculeux essentiels dans le traitement des tuberculoses MDR.
- Il est à noter l'apport de la technique Deeplex Myc-TB® dans la détection de variants minoritaires dans *gyrA* et *gyrB*, témoignant d'un processus de sélection de la résistance dans la population de bacilles tuberculeux. 4 mutations hétérogènes ont ainsi pu être détectées en 2021, avec un impact sur le schéma thérapeutique : A90V (10%), D94A (14%) et D94N (9%) dans GyrA et D461H (10%) dans GyrB

- La recherche de mutations impliquées dans la résistance au **linézolide** dans les gènes *rrl* et *rplC* est effectuée depuis 2017 au CNR. La détection de mutations dans ces deux gènes reste exceptionnelle, et concerne **moins de 5 souches/an**. Une dizaine de mutations différentes ont été observées dans *rrl* depuis 2017, alors qu'une seule mutation a été identifiée dans *rplC* (C154R, dans 6 souches différentes).

- La recherche de mutations impliquées dans la résistance à la **bédaquiline** dans les gènes *Rv0678* (régulateur transcriptionnel de la pompe d'efflux MmpL5, **résistance croisée avec la clofazimine**) et *atpE* (qui code la cible de la bédaquiline), est effectuée depuis 2018 au CNR. La détection de mutation dans ces deux gènes reste rare, avec **moins de 10 souches/an au CNR**. Toutes les mutations ont été identifiées **dans *Rv0678*** (15 substitutions différentes et 5 insertions/délétions) hormis une substitution dans AtpE (I66M, hétérogène à 66%) dans une souche de 2020, chez un patient Géorgien en échec de trois lignes de traitement contenant entre autres de la bédaquiline (Le Ray LF, Emerg Infect Dis 2022). Ceci est en adéquation avec les données internationales : les mutations dans *Rv0678,* responsables d'une élévation modérée des CMI de la bédaquiline*,* étant de loin les plus fréquemment décrites; Celles dans *atpE,* responsables d'une élévation importante des CMI de la bédaquiline, restent pour le moment exceptionnelles dans les souches cliniques.

- L'étude de la **résistance génotypique au délamanide** a été mise en place en 2018, en recherchant des mutations dans les 5 gènes suivants : *ddn*, *fgd1, fbiA, fbiB* et *fbiC*. Compte-tenu du nombre important de gènes, l'approche classique par PCR-séquençage ne pouvait pas être appliquée. Les mutations sont recherchées à partir d'une extraction des données issues de l'analyse du WGS. L'analyse des résultats est par conséquent complexe et nécessite un travail approfondi pour distinguer les polymorphismes phylogénétiques (à priori sans

conséquence sur la résistance) des mutations impliquées dans la résistance. Une seule mutation impliquée dans la résistance a été détectée pour le moment dans **Ddn** (W88STOP) pour 1 souche. Aucune mutation n'a été détectée à ce jour dans *fgd1, fbiA, fbiB* et *fbiC.*

- Très grande diversité des mutations dans le gène ***ethA*** et la zone intergénique ***ethA-ethR*** **chez les souches résistantes à l'éthionamide,** diversité qui rend difficile l'interprétation de l'effet des mutations sur la résistance, à l'instar de ce qui est constaté pour le pyrazinamide.
- Mutations dans le gène *rrs* codant l'ARNr 16S et *eis* qui code une aminoside acétyltransférase inactivant certains aminosides, chez les souches résistantes aux aminosides (amikacine, capréomycine).

2.1.6 Résultats des tests phénotypiques et génotypiques de sensibilité des souches de mycobactéries non tuberculeuses, tendances évolutives

Le CNR-MyRMA concentre ses efforts en matière de tests de sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries non tuberculeuses sur les cas d'infections, en particulier ceux ayant déjà fait l'objet d'un traitement (échecs thérapeutiques et rechutes). En effet, les infections à mycobactéries non tuberculeuses n'étant pas contagieuses, il n'y a pas de résistance 1aire (résistance chez un patient n'ayant pas reçu de traitement) mais seulement de la résistance 2aire (acquise lors d'un traitement). Ceci a été bien démontré par une publication récente du CNR-MyRMA (Renvoisé *et al*. Antimicrob. Agents Chemother. 2015).

Les principaux résultats pour la période 2017-2021 sont les suivants :

- *M. avium-intracellulare* complex : la proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 11% globalement mais de 30% chez les patients ayant des antécédents connus de traitement.
- *M. xenopi* : aucune souche reçue entre 2016 et 2021 n'a été trouvée résistante à la clarithromycine.
- *M. kansasii* : aucune souche reçue entre 2016 et 2021 n'a été trouvée résistante à la rifampicine.
- *M. fortuitum* complex : plus de 70% des souches sont naturellement résistantes à la clarithromycine (présence d'un gène *erm* inductible) et toutes ont été sensibles à la ciprofloxacine (pas de résistance acquise) à l'exception de 2 souches (*M. setense* et *M. porcinum*).
- *M. chelonae* : aucune souche reçue entre 2017 et 2021 n'a été trouvée résistante à la clarithromycine. - *M. abscessus subsp. abscessus* sequevar T28 et *M. abscessus subsp. bolletii* : toutes les souches sont naturellement résistantes à la clarithromycine (présence d'un gène *erm41*inductible), avec de rares souches résistantes à la clarithromycine à haut niveau par mutation du gène *rrl* codant l'ARN 23S (une dizaine sur la période 2017-2021) et rares (environ 5/an) souches résistantes aux aminosides par mutation du gène *rrs* codant l'ARNr16S. Dans ces deux cas, il s'agit de patients ayant reçu un traitement au long cours, atteints de mucoviscidose et recevant des antibiotiques pour une infection à *M. abscessus* ou une bactérie autre qu'une mycobactérie (*Pseudomonas*, Staphylocoque, etc ..),
- *M. abscessus subsp. abscessus* sequevar C28 et *M. abscessus subsp massiliense :* rares souches résistantes à la clarithromycine par mutation du gène *rrl* codant l'ARN 23S. Rares souches résistantes aux aminosides par mutation du gène *rrs* codant l'ARNr16S.

2.1.7 Résistance chez M. leprae

Au total, **483 biopsies** ont été reçues de **2017 à 2021** ce qui a permis le diagnostic de **146 cas de lèpre** (80% nouveaux cas, 20% rechutes et suivis sous traitement) dont **62 en France métropolitaine** (immigrés de pays d'endémie) et **84 dans les DOM-TOM** (**la majorité à Mayotte et Réunion**, puis Nouvelle Calédonie, quelques cas aux Antilles et en Polynésie).
La surveillance de la résistance aux antilépreux a été faite sur les 270 cas rétrospectifs diagnostiqués au CNR-MyRMA entre 2001 et 2021 (103 France métropolitaine, 167 DOM-TOM) permet d'établir les taux de résistance 1aire (11/ 226 = 4,1 %) et 2aire (8/44= 18,2%) (P<0,001). Les cas de résistance étaient 14 cas pour la dapsone, principalement observés en DOM-TOM, 3 cas de résistance à la rifampicine 2aires observés dans les DOM-TOM, alors que les 2 cas de résistance aux quinolones étaient 1aires et observés l'un en Nouvelle Calédonie et l'autre en métropole d'un patient brésilien (Tableau 1). Ceci est cohérent avec les études internationales de surveillance

aux antilépreux que nous avons menées avec l'OMS où la résistance aux quinolones est le plus souvent primaire en rapport avec l'utilisation pour le traitement d'autres types d'infections (ex urinaires, cutanées). Nous remarquons que nous n'avons pas observé de résistance primaire à la rifampicine, contrairement à ce qui est observé dans les pays endémiques pour la lèpre (Brésil, Inde, Indonésie, certains pays d'Afrique comme Madagascar, Mali).

Tableau 1 - Bilan de la surveillance de la résistance aux anti-lépreux chez les patients diagnostiqués en France (2001-2021)

Lieu de naissance ou contage	Cas avec antibiogramme moléculaire			Dont cas résistants		
	Total	Nouveau	Rechutes	Primaire	Secondaire	Mutation
DOM-TOM	167	138	29	9 (8 Dds,**1 Fq****)	8 (5 Dds, 3 Rif****)	P55L (7), T53I (4) T53A, S456L (2) S456F A91V
Etranger	103	88*	15	2 (1 Dds, **1 Fq*****)	0	P55L, A91V
TOTAL	270	226	44	11 (4,1%)	8 (18,2%)	

Dds, dapsone ; Rif, rifampicine ; Fq, fluoroquinolone
* dont 6 patients nés en France métropolitaine mais ayant séjourné longuement en pays endémique, soit en DOM-TOM (n=1), soit à l'étranger (n=5 : 3 en Afrique, 2 en Asie)
** Nouvelle Calédonie ; *** immigrant du Brésil résidant en France ; **** 2 Martinique, 1 Tahiti

2.2 Conseil aux professionnels et aux autorités de santé

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

Le CNR organise depuis 2006 des réunions de **concertation pluridisciplinaire (RCP**, ou TB-consilium) pour aider les collègues cliniciens et microbiologistes à prendre en charge tous les types d'infections à mycobactéries difficile à traiter (multirésistance, intolérance aux antibiotiques, mycobactériose…). Cette RCP historique est maintenant dédiée à la prise en charge des cas de **tuberculose difficile à traiter**.

Par ailleurs, depuis 2018, le CNR a également mis en place deux nouvelles RCP :

- une consacrée à la prise en charge des **infections à mycobactéries non tuberculeuses** (MNT) ou mycobactérioses
- une consacrée à la prise en charge des **cas de lèpre**.

Ces réunions sont assurées par un groupe constitué de membres de l'équipe du CNR-MyRMA, et de praticiens experts. La composition de ces groupes est disponible sur le nouveau site du CNR (https://cnrmyrma.fr/2022/04/04/les-activites-du-cnr/). Les dates de réunion sont fixées à l'avance et les avis sont donnés au cours de téléconférences avec les cliniciens en charge des patients. Chaque discussion fait l'objet d'un rapport écrit envoyé au clinicien.

De **nombreux avis** (traitement de tuberculose MDR ou de mycobactériose, difficulté diagnostique…) **sont donnés hors RCP** directement par des membres du CNR lors d'appels téléphoniques ou par courriel. Cette activité est évaluée à une durée totale cumulée d'au moins un mois d'équivalent temps-plein.

RCP TUBERCULOSE

L'activité de RCP, a beaucoup augmenté lors de la mandature précédente. Elle nécessite maintenant deux réunions mensuelles à la place d'une seule à sa création.

Au total, de **2017 à 2021**, **74 RCP ont permis d'examiner 1045 dossiers correspondant à 664 patients**, chaque patient étant discuté plusieurs fois tout au long du traitement, pour modifications et adaptations.

Au total, que ce soit au travers des réunions plénières des RCP ou de contacts téléphoniques directs, environ **4/5 des cas de tuberculose MDR-XDR font l'objet de conseils thérapeutiques par le CNRMyRMA.**

RCP MYCOBACTERIOSES

L'activité de RCP, a totalisé 40 réunions pour 285 dossiers.
Compte tenu de la diversité des infections à MNT, le groupe comprend des pneumologues, des infectiologues et des dermatologues. En effet, l'activité qui était en 2019 centré sur les infections respiratoires, comprend en 2021 une part égale entre les infections respiratoires et extra-respiratoires, dont une grande partie sont liées aux soins (post opératoire, liées à des dispositifs médicaux de type cathéters, inoculation directe...).

RCP LEPRE

L'activité de RCP, a totalisé 28 réunions pour 68 dossiers. Tous les cas de lèpre diagnostiqués par le CNR ne sont pas discutés en RCP. Seuls les cas difficiles à diagnostiquer ou difficiles à traiter sont discutés, en particulier la prise en charge des réactions lépreuses, les personnes en difficulté de prise en charge médicale (SDF, mineur isolé, migrant sans famille...). Nous acceptons les discussions de cas pour des collègues d'autre pays lors d'expertise particulière (UK, Belgique par ex en 2021).

2.2.2 Conseils auprès des instances sanitaires nationales et internationales

NATIONALES

- Santé publique France et ANSM :
  - Alertes et surveillance des cas d'endocardites à MNT,
  - Infections à MNT liées aux soins,
  - Suivi de l'épidémie européenne à *M. chimaera,*
  - Discussions sur l'accès aux antituberculeux en France
  - Lèpre : conseils donnés aux CLAT, CIRE et ARS pour les nouveaux cas de lèpre multibacillaire
  - Expertise de projets tuberculose
- HCSP et HAS : groupe de travail sur
  - Obligation vaccinale BCG de certaines professions à caractère médical ou social
  - Nouvelles recommandations ITL
  - Infections à *M. bovis*
  - Lèpre
  - eDO
  - Réévaluation de la stratégie de dépistage et de diagnostic de la tuberculose maladie chez les adultes et les enfants, en France
- INSERM - AVIESAN : pilotage de « l'Action Tuberculose » de l'institut thématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M) : élaboration des programmes des réunions scientifiques, organisation de symposia. Cette action tuberculose est maintenant inscrite dans le nouvel institut ANRS-MIE et une Action coordonnée tuberculose (ACTB) sera mise en place en novembre 2022
- MSA (Mutuelle de Santé Agricole) pour la tuberculose bovine
- CA-SFM : antibiogramme des MNT
- SPILF / SPLF : collaboration sur l'accès aux antituberculeux en France
- AFNOR : Mise au point d'une méthode standardisée pour me recherche de mycobactérie dans l'eau

(collaboration avec Eau de Paris). Etablissement d'un document normatif AFNOR en cours

- INRS : Mise à jour de la base d'observation des agents biologiques pour la partie mycobactéries

INTERNATIONALES

- ERLN-TB : les 2 laboratoires participent au réseau des laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries- Tuberculose » de la communauté européenne, pour l'élaboration du programme « tuberculose » de l'ECDC.
- ESCMID :
  - pilotage du « European Study Group for Mycobacteria (ESGMYC) » : Présidence de l'ESGMYC
  - co-organisation des guidelines sur les infections respiratoires à MNT
  - Comité exécutif pour promouvoir l'éducation et la recherche en microbiologie clinique - ERS : membre du collège d'expert et de l'ERS fellowship and awards working group, ainsi que du "long-range planning committee » de la section de l'ERS sur les infections respiratoires.
- Réseau TBnet : responsable de la recherche clinique dans le comité de pilotage
- ESM, ERS, ESCMID, TBnet : coordination des activités de plaidoyer pour l'accès aux antituberculeux en Europe
- ECDC : Participation à la réunion de lancement de la plateforme EpiPulse (décembre 2021) : soumission simultanée des données génomiques et épidémiologiques avec solution de stockage des données brutes de séquençage sur cloud. Objectif de détection de cas groupés (MDR ou non) sur la région Europe, avec visualisation sur carte interactive. Comparaison génomique par méthode de cgMLST.
- ECDC :
  - groupe de travail sur l'épidémie européenne d''infections post-CEC à *M. chimaera* ○ guidelines sur les tests de sensibilité aux antituberculeux et WGS
- EUCAST (European Union Comittee for Antimicrobial Susceptibility Testing) et EMA (European Agency for Medicine) et ESGMYC (ESCMID study group for mycobacterial infections) : élaboration de la méthodologie d'étude des nouveaux antituberculeux
- EUCAST : responsabilité du sous-comité pour les tests de sensiblité aux antimycobactériens
- OMS: groupe des laboratoires pour la détermination de la résistance aux antituberculeux
- OMS « Réseau OMS de surveillance de la résistance aux antilépreux » et au « Technical Advisory Group » :
  - élaboration du programme de lutte mondiale contre la lèpre ;
  - surveillance de la résistance aux antibiotiques (OMS NTD) ;
  - recommandations sur les tests de sensibilité aux antituberculeux
  - groupe expert « Ulcère de Buruli » ;
- OMS Région Europe : partage des résultats d'une enquête européenne sur l'accès aux médicaments et aux tests de sensibilité pour les antituberculeux en Europe
- OMS : partage des données concernant les cas de tuberculose MDR en France (2006/2019) et leur devenir pour contribuer aux analyses pour les nouvelles recommandations de l'OMS sur la prise en charge de la tuberculose résistante aux médicaments (prevues pour 2022)
- Médecins Sans Frontières : pilotage d'un projet international de recherche clinique sur le développement des nouvelles associations de médicaments pour la tuberculose MDR/pre-XDR (endTB)

2.2.3 Information et formation

Le **site internet** http://cnrmyctb.free.fr créé il y a maintenant plus de 15 ans nécessitait une refonte. Il a été entièrement refait avec simplification et meilleure visibilité du contenu. Il est maintenant accessible à l'adresse sécurisée https://cnrmyrma.fr qui correspond mieux au libellé du CNR-MyRMA.
Cette mise à jour s'accompagne de la mise à disposition de 2 adresses génériques afin de joindre les deux sites du CNR pour demande d'expertise et avis

- Cnrmyrma[a]cnrmyrma.fr pour le laboratoire coordinateur de AP-HP.Sorbonne Université
- cnrmyrma.bichat[a]cnrmyrma.fr pour le laboratoire associé de AP-HP.Paris Nord.

Par ailleurs, une adresse de courriel au format prenom.nom[a]cnrmyrma.fr est également disponible pour joindre chaque membre du CNR ; il s'agit d'adresses de redistribution qui renvoient vers le courriel habituel de chaque destinataire.

De 2017 à 2022, le CNR a accueilli 22 stagiaires

De **2017 à 2022** le CNR a assuré **34 missions (**ESCMID, OMS, ERS, ANRS, ILEP, ERLNET, ONG)

Le CNR a été co-organisateur avec la DGS et Santé publique France des **Journées nationales d'information et d'échanges sur la tuberculose en France** en 2017, 2019 et 2022. L'annonce de ces journées a été affichée sur le site du CNR et adressée à tous les correspondants du CNR par courriel.

2.2.4 Conseils aux microbiologistes

Le site internet du CNR liste les techniques recommandées pour le diagnostic, l'identification et les tests de sensibilité aux antibiotiques.
Le CNR a rédigé le chapitre initial du REMIC (référentiel en microbiologie) sur la mycobactériologie et a participé à sa mise à jour en 2021.
Par ailleurs, nous intervenons dans de très nombreux enseignements universitaires, conférences, réunions professionnelles et des sociétés savantes (environ 30 interventions par an) dont le détail est donné dans chaque rapport annuel.

2.3 Contribution à la surveillance épidémiologique

2.3.1 Surveillance de la résistance 1aire et de la résistance 2aire à travers le réseau AZAY-mycobactéries des CHU

Depuis 1995, le CNR-MyRMA surveille la résistance primaire (chez les nouveaux cas) **et la résistance secondaire** (chez les patients ayant déjà reçu un traitement) aux antituberculeux de 1ère ligne (isoniazide [INH], rifampicine [RIF], éthambutol, streptomycine) **à travers le réseau Azay-Mycobactéries des laboratoires de CHU.** Chaque année, les laboratoires du réseau colligent les données de l'année précédente sur environ 1800 **cas de tuberculose à culture positive.** Les données détaillées sont disponibles dans les rapports annuels et un résumé est disponible sur le site internet du CNR-MyRMA.

Les principaux résultats sur les 4 dernières années disponibles (2017 à 2020) sont les suivants :

- baisse importante du nombre de cas recensés en 2020 en probable liaison avec la pandémie Covid-19 (1500 cas vs. 1800 les 3 années auparavant).
- proportion basse et à la baisse (~6%) des cas diagnostiqués chez des patients ayant des antécédents de traitement,
- proportion basse et à la baisse (~5%) des cas diagnostiqués chez les patients VIH,
- stabilisation ces 5 dernières années de la proportion des patients nés à l'étranger (~70%),
- **résistance 1aire à INH plus élevée chez** les patients nés à l'étranger (7,1%) que chez ceux nés en France (4,7%),
- **augmentation de la résistance 1aire à INH** (3,7% en 1995, 6,5% en 2020), ce qui doit faire renforcer les recommandations thérapeutiques de quadrithérapie pour les nouveaux cas, et discuter de la prophylaxie par INH en monothérapie.
- m**ultirésistance 1aire** basse autour de 2%
- r**ésistance 2aire beaucoup plus élevée que la résistance 1aire** à INH (23% en 2020 vs. 6,5%) et RIF (17% en 2020 vs. 2,2%),
- **résistance 2aire beaucoup plus élevée chez** les patients nés à l'étranger que chez ceux nés en France à INH (28,2 vs. 10,4%) et RIF (22,8 vs. 3,9%),
- q**uasi-totalité des cas MDR** secondaires diagnostiquée chez des patients nés à l'étranger,
- m**onorésistance à la rifampicine très rare** (<0,5%) ce qui justifie d'utiliser la résistance à cet antibiotique comme marqueur indirect de multirésistance.

2.3.2 Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants (MDR)

Depuis 1992, le CNR-MyRMA **surveille la multirésistance à travers le réseau de l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie** dont le nombre diminue progressivement mais de manière importante en raison des restructurations des hôpitaux et du secteur privé. En 2020, ce réseau comptait **180 laboratoires.**
Ces dernières années le retour des informations a été compliqué par les regroupements sur des grosses plateformes, la pression de l'accréditation Cofrac sur les laboratoires et la pandémie Covid-19. Ceci a une influence importante sur le dénominateur (nombre total de cas de tuberculose à culture positive) empêchant le réseau de calculer une proportion fiable de cas de MDR. Le calcul du numérateur (total des cas MDR) est assuré par les 3 sources disponibles au CNR : les cas du réseau AZAY-mycobactéries, les cas recencés par le réseau du CNR et les souches reçues au laboratoire du CNR pour analyses complémentaires, ce qui permet un bilan quasi exhaustif des cas.
Dans le cadre de cette surveillance, le CNR collabore étroitement avec Santé publique France afin d'assurer la complétude des données de la DO sur la tuberculose MDR. La qualité de ces informations est importante car ceci permet depuis très récemment que les données françaises des cas MDR soient prises en compte par l'ECDC et WHO Europe dans le bilan Européen annuel de la surveillance de la tuberculose.

Un bilan détaillé des cas est adressé de manière annuelle à Santé publique France et les informations stratifiée par région française mise à disposition dans le rapport annuel et sur le site internet du CNR.

Les principaux résultats sont les suivants :

Le % de cas multirésistants a progressivement quadruplé depuis 1992, passant de 0,4-0,7% entre 1993 et 1998 à 0,9% en 1999-2001, oscillant entre 0,9 et 1,4 % de 2002 à 2010, puis 1,7% en 2011, 2,1% entre 2012 et 2018.

La **distribution régionale des cas MDR** identifiés par le CNR-MyRMA est restée globalement stable pour l'Ile de France (autour de 50%), mais a légèrement augmenté pour Auvergne-Rhône-Alpes (7% en 19921996 à 10% en 2017-2021), la Bretagne (de <1%% à 5%), le Grand-Est (1% à 5%) et Nouvelle-Aquitaine (3% à 6%). Cette proportion a diminué en PACA (11% à 3%), et dans le Grand-Est (10% à 6%).

Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont modifiées au cours des 28 années de la surveillance débutée en 1992
Il faut noter entre 1992 et 2011 une diminution constante des proportions représentées :
. par les hommes (74% à 58%)
. par les patients avec antécédents de traitement (73% à 37%)
. par les patients nés en France (49% à 17%). L'augmentation de la proportion de patients nés à l'étranger (de 51% à 83%) était liée aux patients nés en Europe (Europe de l'est et ex-URSS) et en Afrique subsaharienne.

Au cours des 5 années 2012-16, s'est produit, par rapport aux années précédentes : un retour à une très grande majorité de cas de sexe masculin (72%), plus de cas nés en Europe (49%), plus de cas sans antécédents de traitement (63%). Ceci est lié à l'augmentation de cas de résistance 1aire chez des hommes nés en Europe de l'Est, principalement en Géorgie.

Les caractéristiques des patients identifiés au cours de 2017-2020 sont très proches de celles des cas de la période 2012-2016, en dehors d'une proportion quasi identique (33%) de patients nés en Afrique subsaharienne et de patients nés en Europe de l'Est.

2.3.3 Registre national des cas de tuberculose MDR en France

La mise en œuvre du registre national des cas de tuberculose MDR a commencé en 2020. Jusqu'à présent, deux réunions du Conseil Scientifique du Registre ont eu lieu. Pour rappel, le Conseil Scientifique est constitué du Directeur du CNR-MyRMA en activité, du coordonnateur de la RCP « Groupe Thérapeutique des Infections à

Mycobactéries » du CNR-MyRMA, du médecin coordonnateur du registre, d'un représentant de Santé Publique France, de médecins du Sanatorium du Centre Hospitalier de Bligny, des CHU de la Pitié-Salpêtrière et de Bichat (Paris) et du CHU de Lyon, d'un Médecin représentant la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et d'un médecin représentant la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF). Les patients sont identifiés à la fois par un code propre au registre et par un code unique d'anonymisation Santé Publique France. Sur le plan informatique, le registre est fonctionnel et hébergé par un partenaire détenant l'autorisation d'héberger des données de santé. Le projet devait se poursuivre avec une mise en place "en routine" du registre dans les centres pilotes (Paris Pitié- Salpêtrière, Paris Bichat, Bligny, Lyon, et Rennes). Ceci a été fortement ralenti par l'épidémie de SARS-CoV-2 qui a fortement impacté les activités tuberculose dans les centres pilotes. Cependant, le registre a été utilisé activement pendant les RCP : toutes les données microbiologiques phénotypiques et génotypiques (saisies lors de la RCP), les données cliniques du patient et concernant la tuberculose (saisies en ligne par le clinicien en charge), ainsi que la question posée par le clinicien à la RCP et l'avis donné par les experts de la RCP ont été saisies prospectivement dans le registre.
Des améliorations fonctionnelles informatiques ainsi que la mise à disposition de ressources dédiées à l'implémentation à plus large échelle du registre sont envisagées (Chapitre 7).

Données présentes au 31 Mars 2022 dans la base de données du registre :

- 95 patients atteints de tuberculose MDR, traités initialement dans 34 centres différents en France (8 en Ile-de-France, 26 en dehors d'Ile-de-France) ;
- 47 utilisateurs actifs provenant de 14 centres (sans compter le CNR-MyRMA).

2.3.4 Surveillance de la tuberculose à M. bovis à travers le réseau AZAY-mycobactéries

La proportion de *M. bovis* parmi l'ensemble des cas de tuberculose **est en légère augmentation** lors de cette dernière mandature (2,1%) par rapport aux années 2012-2016 (1,6% ; p=0,03) pour les laboratoires identifiant systématiquement les espèces au sein du complexe *M. tuberculosis*. Cette légère augmentation ainsi que les alertes de tuberculose dans la faune sauvage justifient de continuer la surveillance et de renforcer systématiquement les enquêtes autour d'un cas.

2.3.5 Surveillance de la méningite tuberculeuse à travers le réseau CNR-MyRMA

Le CNR-MyRMA recueille le nombre et l'incidence des cas de méningite tuberculeuse (MTB) chez les enfants ≤ 5 ans qui constitue un indicateur proposé par l'Union Internationale contre la Tuberculose (IUATLD) pour juger de l'impact de la politique de vaccination par le BCG, politique qui a été modifiée en France en 2007.
Cette surveillance est intégrée à l'enquête annuelle concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants ≤ 5 ans à travers son réseau de laboratoires. Il y avait eu **une légère augmentation du nombre de cas à 3-4 cas/an dans la mandature 2012-2016 au lieu de 0-1 les années avant 2012**. Ce chiffre de 3-4 cas/an est **resté stable ces 4 dernières années.**

2.3.6 Surveillance de la lèpre en France

Depuis les actions de motivation menées en 2012-2013 par le CNR-MyRMA auprès des interlocuteurs des DOM-TOM et des missions au dispensaire de léprologie de Mayotte, DOM où la lèpre reste prévalente (~15 cas / 10^5 habitants /an), nous recevons de nombreuses biopsies pour suspicion de lèpre ce qui a permis de confirmer le diagnostic **de 304 cas de lèpre entre 2001 et 2021 dont 65% dans les DOM-TOM (principalement à Mayotte et en Nouvelle Calédonie) et les 35% restants en métropole chez des migrants** de pays où la lèpre est prévalente (Indes, Sri Lanka, Pakistan, RDCongo, Mali, Sénégal, Madagascar, Comores, Brésil, Haïti…). Les cas font l'objet d'une surveillance génotypique de la résistance aux antilépreux (dapsone, rifampicine et fluoroquinolones) et phylogénique (SNP-type) (voir ci-dessus chapitre 3).
Comme il n'y a pas de déclaration obligatoire, nous recevons des demandes de conseils (RCP) ou de tests d'expertise pour des cas qui ont déjà été diagnostiqués avec un traitement débuté voire fini, mais qui présentent des complications (réactions, intolérance médicamenteuse...) ou des suspicions de rechutes. Il nous paraitrait plus raisonnable et bénéfique pour le patient d'harmoniser la prise en charge à partir d'un diagnostic avéré et déclaré.

2.3.7 Surveillance génotypique des souches de *M. tuberculosis* : détection et investigation des cas groupés

De 2017 à 2022, le CNR-MyRMA a réalisé le génotypage (empreintes digitales génomiques) **de 826 souches de *M. tuberculosis* par la méthode MIRU-VNTR de 24 loci.** Depuis 2020, la comparaison des souches MDR/XDR est réalisée en systématique (approche "*sequence first*") **par analyse WGS** (distance en nombres de SNVs), la méthode MIRU-VNTR 24 loci n'étant pas assez résolutive pour l'analyse fine de certains clusters, notamment au sein de la lignée Beijing.
Ceci a permis d'apporter les informations suivantes, en complément des enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les autorités sanitaires (CLAT…) :

Pour les souches non multirésistantes (études menées si suspicion de cas groupés)
- 85 épisodes de cas groupés dans les familles et dans la communauté, totalisant 251 cas (2 à 13 cas par épisode)
- 8 épisodes de cas groupés en milieu de soins, totalisant 18 cas (2 à 8 cas par épisode)
- 5 cas de vraies rechutes et non de réinfection
- 19 épisodes de contamination inter-prélèvements au laboratoire totalisant 49 cas (2 à 8 cas par épisode)

Pour les souches multirésistantes (étude systématique de tous les cas)
- 100 épisodes de cas MDR reliés bactériologiquement, totalisant 119 cas (2 à 17 cas par épisode). La grande majorité des cas MDR reliés concernent des transmissions familiales, mais il faut noter : 2 infections nosocomiales, 2 cas en foyer d'hébergement, 1 cas en milieu de travail, 6 cas en milieu communautaire et familial chez des patients nés en RDCongo sur une période de 4 ans, 17 cas en milieu communautaire et familial en Polynésie française sur une période de 7 ans (2015-2022), 13 cas en milieu professionnel et familial en Corse, sur une période de 8 ans.
- les lignées phylogéniques dominantes sont : Beijing, Haarlem et LAM.

2.3.8 Apport des tests Interferon (IGRA) dans l'estimation de la prévalence de l'infection tuberculeuse

Les tests IGRA pour la tuberculose *(*quantification de l'IFN-γ produit in vitro par les CD4 circulants activés par les antigènes ESAT-6 et CFP-10 de *M. tuberculosis*) sont maintenant faits dans de nombreuses régions de France et chez différentes populations selon les recommandations de l'HAS. Entre 2017 et 2021 nous avons augmenté notre expertise pour les tests *QuantiFERON®-TB (Qiagen)* en pratiquant des comparaisons de performances des versions successives de ces tests (3 tubes versus 4 Tubes) ainsi que la validation analytique des tests sur différentes plateformes (Etimax de chez Diasorin, Dynex DS2 de chez Qiagen, Liaison XL de Diasorin). Le laboratoire a été accrédité pour ces deux plateformes.
Nous avons aussi participé au développement et à l'évaluation d'un nouveau test IGRA-TB basé sur les antigènes spécifique de *M. tuberculosis* complex, proches de ceux du test Quantiferon mais utilisant la plateforme technique VIDAS3 (biomerieux). Cette plateforme permet d'une part de faire des tests à la demande, un par un et non en série, et d'autre part est beaucoup plus simple pour la phase pré-analytique puisqu'il se pratique du sang total prélevé dans un seul tube standard en héparinate de lithium.
Les études internationales de comparaison des performances de test VIDAS-IGRA-TB et Quantiferon Gold plus (4 tubes) auxquelles nous avons participées (étude de la courbe Roc et étude des performances cliniques) ont montré une plus grande sensibilité chez des patients atteints de tuberculose, liée en partie à la forte diminution des résultats dits "indéterminés" et une plus grande spécificité mesurée chez les personnes donneuses de sang non à risque d'avoir été infectées. Ces résultats sont soumis à publication.

A partir de 2022, nous ferons les tests d'infection tuberculeuse avec les deux trousses en fonction des besoins : trousse VIDAS-TB IGRA en cas de résultats indéterminés avec la trousse Quantiferon, si le préanalytique est difficile à suivre (plus de 16h entre prélèvement et arrivée au laboratoire), patient avec suspicion de tuberculose ; et trousse Quantiferon sur plateforme Liaison XL pour les autres tests tout venant, et les enquêtes d'infection autour des cas.

2.4 Contribution à l'alerte

Le CNR-MyRMA est mis à contribution par les autorités sanitaires (ARS, InVS, DGS), ou émet spontanément des alertes concernant des cas inhabituels de tuberculose ou de mycobactériose par leur circonstance de survenue, leur groupement, l'espèce ou la souche en cause.

Les évènements marquants pour la période 2017 – 2021 ont été les suivants :

- Une épidémie communautaire de 13 cas de tuberculose MDR dans la région de Lille principalement étalée sur 8 ans
- Une épidémie communautaire de 12 cas de tuberculose MDR à Tahiti étalée sur 5 ans
- Une épidémie communautaire de 16 cas de tuberculose MDR dans la région parisienne étalée sur 5 ans - Une épidémie communautaire étalée sur 7 ans de 16 cas de tuberculose sensible avec un cas index dans l'Ain et des cas secondaires identifiés sur l'ensemble du territoire national
- Alerte européenne puis mondiale d'infection post CEC (endocardites, spondylodiscites, …) à *M. chimaera* liés aux générateurs thermiques utilisés dans les blocs opératoires pour la CEC. Ces dispositifs n'étaient pas équipés en eau stérile ou bactériologiquement maitrisé et ont pu relargué des mycobactéries pendant l'intervention chirurgicale. De plus, la démonstration que tous les cas étaient infectés par une souche de génome identique ou proche, a permis de montrer que l'épidémie était liée à une contamination massive à *M. chimaera* des générateurs thermiques lors de leur fabrication dans les usines situées en Allemagne. Cette épidémie a permis de pratiquer une enquête approfondie avec Santé publique France sur l'usage des générateurs thermiques au bloc opératoire dans les établissement pratiquant la chirurgie cardiothoracique.
- Alerte européenne de plusieurs cas d'endocardites à mycobactéries en Allemagne et en France sur bioprothèse survenus entre 2018 et 2022. Les sociétés Labcor (5 en 2018, 1 en 2022) et BioIntegral Surgical (1 en 2022) ont été successivement impliquées, ce qui a conduit à ne plus implanter certaines valves et conduits valvés en conséquence. Les investigations sont toujours en cours pour trouver la nature (identité de la mycobactérie) et la source de l'infection.

3 Liste des publications et communications 2020-2021

Toutes les publications du CNR-MyRMA sont disponibles sur le site du CNR à la page https://cnrmyrma.fr/publications/

Nous listerons donc ici uniquement les communications / congrès auxquels le CNR a participé.

3.1 Communications Nationales (sans invitation)

1. L. Deneuville, C. Verdet, P. Lévy, A. Parrot, J.M. Naccache, G. Pialoux, N. Veziris, J. Cadranel. Caractéristiques et pronostic des malades avec prélèvements respiratoires positifs pour mycobactéries non tuberculeuses (MNT)-étude de cohorte rétrospective de 171 cas consécutifs.24ème Congrès de Pneumologie de Langue Française, Paris, 2020.
2. N. Veziris, Andrejak C, Chiron R, Obradovic M, Charillat J, Emery C, Bouee S. Burden of nontuberculous mycobacterial lung disease (NTMLD) in France: a claim database analysis. 40ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris. 2020
3. I. Bonnet, J. Jaffré, V. Enouf, Ok V, F. Morel, A. Aubry, J. Robert, W. Sougakoff. Détection rapide de la résistance chez *M. tuberculosis* par Deeplex. RICAI, Paris 2020
4. E. Lecorche, V. Baron, D. Mohand-Oussaid, C. Avanzi, A. Chauffour, E. Klement, F. Mougari, H. Benmansou, V. Jarlier, E. Cambau. Using whole genome sequencing to assess *M. leprae* transmission in French overseas Territories. 15e JMLF, 10-11 septembre 2020, Faculté de Médecine de Montpellier
5. J. Ory, E. Lecorche, C. Enault, C. Aumeran, E. Cambau, K. Barrigah-Benissan, O. Traore, J. Lavigne, A. Pantel. Epidémie de bactériémies à *Mycobacterium mucogenicum* dans un Institut de Cancérologie liée à une

contamination du réseau d'eau. Titre session : COM-04 - Environnement hospitalier ou "inhospitalier" RICAI 2020.

6. E. Manteaux, I. Bonnet, H. Watry, F. Morel, E. Jeanmaire, W. Sougakoff, A. Lozniewski, A. Aubry, C. Alauzet. Tuberculose MDR : quelle approche utiliser pour détecter les souches portant des mutations en dehors de la région RRDR ? Journées de Mycobactériologie de Langue Française. Montpellier. 2020.

3.2 Communications Internationales (sans invitation)

1. A. Godmer, N. Mohammad, L. Benzerara, A.C. Normand, N. Veziris, R. Piarroux, A. Aubry. A deep learning model for Mycobacterium abscessus complex subspecies identification with MALDI-TOF MS. 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Online, 2021.
2. L. Fournier Le Ray, A. Aubry, W. Sougakoff, M. Revest, J. Robert, I. Bonnet, N. Veziris, F. Morel. Bedaquiline resistance: looking for the submerged part of the iceberg 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Online, 2021.
3. T. Maitre*, S. Lociuro, M. Pieren, A. Chauffour, L. Fournier Le Ray, A. Aubry, N. Willand, A. Baulard, M. Remuiñán, J. Rullás, G. Dale, M. Gitzinger, N. Veziris. Bactericidal activity of ethionamide alone and boosted by BVL-GSK098 in an acute murine model of tuberculosis. 31th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2021, E-oral poster session
4. F. Morel, C. Bernard, T. Ioerger, N. Veziris, J. Robert, W. Sougakoff, A. Aubry. Deciphering fluoroquinolone resistance mechanisms other than DNA gyrase mutations in Mycobacterium tuberculosis by whole genome sequencing. 32th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2021,
5. L. Guglielmetti. Availability of drug susceptibility testing to new/re-purposed anti-tuberculosis drugs: a TBnet study. Presented at Congress of the European Respiratory Society (08/09/2021)
6. E. Cambau. B. Heid-Picard, A. Pouvaret, F. Mougari, F. Lanternier, E. Bille, : O. Lortholary, E. Cambau. Extrapulmonary *Mycobacterium abscessus* infections: a nationwide study in France (2013-2019) ECCMID 2021, juillet 2021
7. E. Cambau. K. LA, Z. Awad, F. Mougari, V. OK, B. Heid, A. Bridier-Nahmias, E. Cambau. Etude GWAS de *Mycobacterium abscessus* dans les infections respiratoires et extra-respiratoires Congrès de la Société Française de Microbiologie, Septembre 2021
8. S. Tunesi, A. Skrahin, M. Musso, G. Bothamley, E. Caumes, M. Frechet-Jachym, D. Goletti, G. Gualano, C. Lange, X. Lescure, D. Marigot-Outtandy, F. PalmierI, D. Vetushko, N. Veziris, D. Le Du, L. Guglielmetti. Safety and efficacy of co-administration of direct-acting antivirals for HCV and drugs for MDR-TB: a multi-country TBnet and ESGMYC cohort study 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Online, 2021
9. T. Maitre, S. Lociuro, M. Pieren, A. Chauffour, L. Fournier Le Ray, A. Aubry, N. Willand, A. Baulard, M. Remuiñán, J. Rullás, G. Dale, M. Gitzinger, N. Veziris. Bactericidal activity of ethionamide alone and boosted by BVL-GSK098 in an acute murine model of tuberculosis. 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, OnlinBIOMEDkie, 2021
10. R. Van Der Laan, M. Obradovic, S. Bouee, C. Nevoret, N. Veziris. Risk factors for non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease in France based on health claims database analysis. 2nd European NTM & Bronchiectasis Workshop, Milan, Italy, 2021
11. F. Morel, C. Bernard, T. Ioerger, N. Veziris, J. Robert, W. Sougakoff, A. Aubry. Deciphering fluoroquinolone resistance mechanisms other than DNA gyrase mutations in *Mycobacterium tuberculosis* by whole genome sequencing. 32th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, 2021 (abstract n° 01310). Congrès international
12. L. Fournier Le Ray, A. Aubry, W. Sougakoff, M. Revest, J. Robert, I. Bonnet, N. Veziris, F. Morel. Bedaquiline resistance: looking for the submerged part of the iceberg. 31th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, 2021 (abstract n°03158).
13. A. Godmer, N. Veziris, C. Eckert, S. Gallah, A. Aubry, L. Benzerara. Detection of antimicrobial resistance in Mycobacterium abscessus complex by MALDI-TOF MS. 30th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020
14. F. Morel, G. Millot, J. Jaffre, A. Aubry, N. Veziris, J. Robert, V. Jarlier, E. Tagliani, W. Sougakoff Genomic analysis of multi-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in France: evolution from 2006 to 2018. 30th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020

15. N. De Castro, F. Méchaï, D. Bachelet, A. Canestri, V. Joly, M. Vandenhende, D. Boutoille, M. Kerjouan, N. Veziris, J. Molina, N. Grall, P. Tattevin, C. Laouenan, Y. Yazdanpanah. Detection of rifampin and isoniazid resistance using molecular testing to initiate an ethambutol-free 3-drug regimen in pulmonary tuberculosis: a French noninferiority multi-centre randomised clinical trial. 30th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020
16. S. Chiesi, L. Guglielmetti, M. Bachir, A. Aubry, N. Veziris, N. Lemaitre, J. Robert. Are large cities at higher risk for tuberculosis drug resistance? A French appraisal. 30th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020
17. R. Chiron, N. Veziris, C. Andrejak, W. Hoefsloot, Z. Aoun, C. Audoly, D. Basille, A. Benattia, A. Bergeron, J. F. Bervard, J. F. Boitiaux, A. Bourdin, D. Bouvry, J. Cadranel, G. Chatté, L. Colombain, J. L. J. Couderc, B. Crestani, J. Crouzet, G. Desléee, B. Douvry, M. Drevait, M. Dupuy Grasset, S. Jouneau, M. Kerjouan, S. Leroy, T. Maitre, J. P. Mallet, M. Massongo, M. Murris Espin, A. Payet, P. Predère, A. Prevotat, C. Rogé, F. Schlemmer, L. Slim, C. Toper, F. Tritar, M. C. Parizi, V. Bouix, F. X. Blanc, E. Catherinot. An expert statement on clinical considerations before treating NTM lung infection. European Respirarory Congress. 2020
18. T. Maitre, S. Lociuro, M. Pieren, A. Chauffour, L. Fournier Le Ray, A. Aubry, N. Willand, A. Baulard, M. Gitzinger, N. Veziris. Drug combinations against multi-resistant bacteria. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. E-oral poster session. 2020
19. I.Bonnet, S. Goumghar, G. Millot, J. Jaffré, A. Aubry, J. Robert, W. Sougakoff. One-year evaluation of Genelead VIII combined to Deeplex-MycTB to detect rapidly the genotype and the resistance profile of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from clinical samples. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2020
20. A. Bleibtreu, I. Bonnet, S. Jaureguiberry, B. Fautrel, E. Caumes, J. Robert, E. Fourniols, A. Aubry. Clinical features of infection caused by non-tuberculous mycobacteria: 9 years' experience. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2020
21. A. Chauffour, E. Lecorche, F. Mougari, A. Aubry, R. Andriamirandriana, M. Kodio, A. Fomba, S. Sow, G. Moussa, M. Sidibe, B Cauchoix, R.C. Johnson, V. Jarlier, E. Cambau. The rates of antimicrobial resistance in leprosy are higher among cases diagnosed in France than in those diagnosed in African countries (WHO sentinel surveillance network). 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2020
22. F. Méchaï, H.Cordel, A. Aubry, M. Jankovic, M. Viveiros, M. Santin, D. Goletti, L. Guglielmetti, E. Cambau, on behalf of the ESGMYC group. Management of tuberculosis in Europe. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2020

3.3 Communications Nationales (sur invitation)

1. E. Cambau. Hôpital Lariboisière, service de medecine interne, E. Cambau et F. Mougari : Tuberculose en 2021 : quoi de neuf?, juin 2021
2. E. Cambau. Journée Mycomed : Bilan des infections à *Mycobacterium chimaera ;* octobre 2021
3. N. Veziris. Tuberculose : quelles nouveautés en 2021 ? BIOMED J. Paris, France, 2021.
4. N. Veziris. Tuberculose de la femme enceinte et prise en charge du nouveau-né. XXIVème Journée de Microbiologie Clinique du Col. BVH, Paris France, 2021
5. N. Veziris. Mycobactéries non tuberculeuses réfractaires. 9es Journées du GREPI. Chantilly, France, 2021.
6. N. Veziris. Non-tuberculous mycobacteria: the new kid on the block? SSP/SSTS – EFP Joint Annual Meeting 2021. Geneva, Switzerland, 2021
7. F. Morel. “Génomique et résistance aux antituberculeux », 41ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse., 2021, Paris Congrès national
8. A. Aubry. Tuberculose. webinars hebdomadaires de Microbiologie Clinique – Le Remic’s de la SFM. 2021
9. A. Aubry. Nouvelle définition des souches XDR. Congrès annuel du Mycomed, Paris.2021
10. A. Aubry. Nouveautés dans les traitements antituberculeux, Hôpital Beaujon, Clichy. 2020
11. L. Guglielmetti, N. Veziris. Tuberculoses difficiles à traiter. Colloque Experts Praticiens Infectiologie, Paris, 2020
12. N. Veziris. Nouveaux antituberculeux. 21èmes journées nationales d’infectiologie. Poitiers, 2020.
13. A. Aubry. La tuberculose : une pandémie toujours d’actualité. Congrès de la Société Francaise de Mircobiologie. 2020.

3.4 Communications Internationales (sur invitation)

1. L. Guglielmetti. Latest news in TB/MDR-TB treatment: towards a shortening of TB treatment. Webinar for the INNOVA4TB network (22/06/2021)
2. L. Guglielmetti: Year in review: treatment of TB. Presented at European Advanced Course in Clinical TB, Borstel, Germany (09/06/2021)
3. L. Guglielmetti: The impact of COVID-19 pandemic on TB clinical trials. Presented at Russian Congress for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russian Federation (22/05/2021)
4. L. Guglielmetti: ESCMID Postgraduate Education Course on « Update in TB and NTM infections diagnosis and clinical management », Santiago, Chile. Session on "best options for MDR-TB"(1517/04/2021)
5. E. Cambau. ESCMID post graduate course « update in tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections, diagnosis and clinical management » Chile, virtuel en avril 2021 : Nontuberculous mycobacteria identification and susceptibility, what is needed at the laboratory level ? Diagnosis of tuberculosis drug resistance, where should we aim ?
6. E. Cambau. ERS-ESCMID Master Class: Latent TB infection – diagnosis and treatment, mai 2021
7. E. Cambau. OMS-lèpre: séminaire virtuel sur la surveillance de la résistance aux antilépreux : Diagnosis of antimicrobial resistance to anti-leprosy drugs: recent advances, virtuel en juin 2021
8. E. Cambau. Congrès European congress on clinical microbiology and infectious diseases (ECCMID) 2021; Advances in mycobacterial AST, on behalf of the EUCAST subcommittee of antimycobacterial susceptibility testing (EUCAST-AMST), virtuel en juillet 202
9. E. Cambau. Congrès European Respiratory Society (ERS): Update in diagnosis of mycobacterial infections; virtuel en septembre 2021
10. E. Cambau. ESCMID Summer school: Update in diagnosis of mycobacterial infections, Septembre 2021
11. E. Cambau. ECDC – WHO Europe; séminaire sur les tests urinaires dans le diagnostic de la tuberculose: Urinary LAM detection for improving the tuberculosis diagnosis of patients in Europe, virtuel en octobre 2021
12. N. Veziris. ARIKAYCE® liposomal in practice – a clinician's perspective. 4th World Bronchiectasis & NTM Conference. Online, 2020
13. E. Cambau. Reference method for susceptibility testing in tuberculosis; reseau européen ERLTB net et ECDC, Janvier 2020 Lisbonne
14. E. Cambau. EUCAST antimycobacterial susceptibility testing: meeting with companies about the new reference method; EUCAST meeting in Malmö février 2020
15. E. Cambau. Updates on diagnosis of leprosy – early detection and antimicrobial resistance, congrès annuel de l'American society of tropical medicine and hygiene, octobre 2020
16. E. Cambau. Antimicrobial resistance monitoring in Leprosy treatment; WHO neglected tropical diseases: Webinar on NTDs and prevention of antimicrobial resistance, novembre 2020
17. W. Sougakoff. DEEPLEX: a novel approach for fast detection of multidrug resistant TB from clinical specimens. MOOC "Tuberculosis" organisé par l'Institut Pasteur de Paris. Novembre 2020
18. Establishing new treatments: the role of randomized controlled trials. Congress of the European Respiratory Society (08/09/2020)
19. L. Guglielmetti. COVID-19 and TB – current evidence and clinical lessons learned. Webinar organized by the Latvian WHO Collaborative Center, Riga (22/05/2020)

3.5 Organisation de congrès

1. J. Robert. Co-organisation avec SPF et la DGS de la journée nationale d'échange sur la tuberculose, mars 2022
2. E. Cambau. European congress on clinical microbiology and infectious diseases (ECCMID) 2021; virtuel en juillet 2021
3. E. Cambau. EUCAST AMST workshop on the 4th of February 2020, Malmö, Sweden on the EUCAST reference method for the *Mycobacterium tuberculosis* complex.

4 PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2023-2027

4.1 Activités d'expertise

Dans le cadre de ses missions, les deux laboratoires du CNR-MyRMA sont organisés pour recevoir, en provenance de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et DOM-TOM (laboratoires hospitaliers, LABM...), les souches et prélèvements pour identification et/ou étude génotypique et phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques et/ou génotypage à visée épidémiologique pour *M. tuberculosis,* les mycobactéries non tuberculeuses (MNT), ainsi que pour le diagnostic de lèpre.

Les deux laboratoires du CNR-MyRMA ont choisi de **ne pas assurer d'activité de sous-traitance** de mycobactériologie de routine afin de se concentrer sur ses missions. C'est pourquoi les prélèvements ou souches reçus ont, dans la très grande majorité déjà été en partie analysés dans le laboratoire d'origine. Les activités d'expertise mises en œuvre par les laboratoires du CNR-MyRMA sont celles qui ne sont pas disponibles dans les laboratoires correspondants.

Nous souhaitons continuer à concentrer nos efforts :

- pour *M. tuberculosis complex* : sur les **souches anormales ou résistantes** et, inversement, limiter le travail sur les souches multisensibles (aujourd'hui ~1/3 des souches de Mtb reçues) qui peuvent plus facilement être prises en charge par les laboratoires de mycobactériologie de routine, en dehors de situations particulières, par exemple suspicion de résistance finalement non confirmée, intolérance aux antituberculeux de première ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats…
Ce choix introduit délibérément un biais de recrutement et ce n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour expertise que l'on peut établir des statistiques représentatives de résistance en France, mais des statistiques robustes sont établies par les travaux menés à travers nos 2 réseaux partenaires.
En revanche, l'analyse des souches reçues permet une étude précise et la plus exhaustive possible des mécanismes de résistance prévalents en France, et ce d'autant plus depuis la mise en place de l'analyse systématique en WGS des souches MDR/mono-résistantes rifampicine, et de profil de résistance atypique. Les données génomiques obtenues sont ensuite colligées et rapportées aux résultats de l'antibiogramme phénotypique réalisé au CNR, ainsi qu'à la lignée phylogénétique.

- pour les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) : sur les **cas avérés d'infections**. Nous étudions en particulier la résistance aux antibiotiques chez les cas ayant déjà fait l'objet d'un traitement (échecs thérapeutiques et rechutes). En effet, les infections à MNT n'étant pas contagieuses, il n'y a pas *a priori* de résistance primaire liée à la transmission d'une souche résistante d'un autre patient. Ceci a été bien démontré par une publication du CNR-MyRMA (Renvoisé *et al*. Antimicrob. Agents Chemother. 2015). Des cas de résistance sont observés chez des patients recevant régulièrement des antibiotiques, comme les patients atteints de mucoviscidose.
Nous étudions aussi avec attention les cas résultant d'un **acte thérapeutique ou de soins** (Infections associées aux soins), en complétant les investigations autour des cas menées souvent avec les ARS et les CIRE. Nos analyses sur la souche responsable d'infection sont complétées par celles sur les souches de mycobactéries résultantes d'une investigation environnementale faite par les EOH lorsqu'il s'agit d'établissement de santé ou par les CIRE qui nous envoient les prélèvements environnementaux avec si besoin l'aide d'organismes spécialisés dans la bactériologie environnementale, telles que « Eau de Paris ». Depuis que nous assurons une **RCP sur les infections à MNT**, nous privilégions l'étude des souches correspondant aux cas discutés pour le diagnostic, le traitement ou la prise en charge.
Enfin, nous sommes prêts à assurer l'identification d'espèces rares, même en dehors des situations cliniques ci-dessus.

- pour la lèpre : sur les cas de lèpre multibacillaire ou lépromateuse, en particulier ceux pour lesquels nous pouvons étudier les gènes de résistance aux antilépreux et ceux pour lesquels le traitement standard ne peut être donné (intolérance, résistance, difficulté de compliance...).

La structure et l'organisation actuelles du CNR-MyRMA permettent de faire face à la prise en charge d'environ 1000 souches/prélèvements par an pour analyses phénotypiques (antibiogrammes) et génotypiques (dont le WGS).

4.1.1 Réseaux de partenaires et collaborations

L'équipe du CNR-MyRMA est à la disposition des collègues bactériologistes des laboratoires de biologie médicale, hospitaliers et privés, soit directement par téléphone ou courriel soit à travers le site internet https://cnrmyrma.fr (environ 1000 appels et courriels par an).

Nous travaillons en particulier avec nos collègues des laboratoires des CHU (35 laboratoires pour 44 centres hospitaliers) qui constituent le réseau AZAY-mycobactéries mis sur pied il y a plus de 35 ans par les Prs Jacques Grosset (ancien directeur du CNR-MyRMA) et Bernard Carbonnelle. Ce réseau est piloté depuis quelques années par le Pr Nadine Lemaitre, ancienne AHU dans le laboratoire et aujourd'hui PUPH au CHU d'Amiens. Nous organisons avec ce réseau des rencontres, des enquêtes et des travaux communs en collaboration avec le groupe Mycomed de la Société Française de Microbiologie. Le CNRMyRMA pilote la partie surveillance du réseau AZAY-mycobactéries depuis son origine.
L'objectif est d'intégrer à ce réseau les CHU d'outre-mer qui n'existaient pas à la création du réseau. Des propositions ont déjà été faite dans ce sens mais sans réponse.

Grâce au réseau créé par le CNR-MyRMA en 1992 qui réunit les laboratoires de biologie médicale pratiquant la mycobactériologie (150 laboratoires actuellement), nous pouvons diffuser des messages d'informations et mener des enquêtes spécifiques sur la tuberculose multi-résistante, les méningites tuberculeuses… (cf. Rapports d'activité). Les laboratoires outre-mer participent régulièrement à ce réseau.

La pandémie Covid-19 s'est ajoutée à l'accréditation Cofrac pour détourner les forces des laboratoires de la surveillance vers d'autres activités. Nous nous attacherons à pérenniser ces 2 réseaux durant la prochaine mandature.

4.1.2 Techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents, en développement ou dont le développement est prévu

IDENTIFICATION DES SOUCHES DE MYCOBACTERIES DU COMPLEXE TUBERCULOSIS ET DE MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES

Stratégie d'identification de l'espèce au sein du complexe *M. tuberculosis*
Nous proposons que soit identifiées au niveau de l'espèce (*M. africanum, M. bovis*, *M. bovis* var. BCG, *M. africanum, M. microti, M. caprae, M. canetti, M. pinnipedi*) **toutes les souches du complexe *M. tuberculosis* reçues au CNR** quand ceci n'a pas été fait dans le laboratoire d'origine et en particulier dans les contextes suivants, (a) souches multirésistantes, (b) contextes épidémiologiques particuliers (par exemple contact avec des animaux tuberculeux), (c) souches dont les caractères phénotypiques ou de résistance aux antituberculeux font suspecter une sous-espèce particulière (souche dysgonique, résistance au pyrazinamide etc…) et (d) en cas de demande spécifiée.

Stratégie d'identification des mycobactéries non tuberculeuses

Pour les mycobactéries non tuberculeuses, les méthodes conventionnelles basées sur des caractères phénotypiques biochimiques et enzymatiques ne sont plus utilisées. La stratégie décrite ci-dessous sera appliquée dans les 2 laboratoires du CNR-MyRMA.

L'amélioration des méthodes d'extraction protéique et des bases de données nous permettra d'utiliser systématiquement la **spectrométrie de masse en MALDI-TOF** (Bruker, base Mycobactéries V3.0 et base 4.0 en préparation). L'acquisition des spectromètres de masse de dernière génération (MALDI Biotyper Sirius acquis en

2021 sur le site du laboratoire associé) sur chacun des sites permettra d'améliorer encore les performances d'identification, en particulier grâce à la possibilité d'analyse des lipides.
Les méthodes de biologie moléculaire telles que PCR suivie de séquençage Sanger sont encore utiles pour l'étude des gènes conservés *hsp65, rpoB, rDNA16S,* région intergénique *16s-23.* Ces méthodes sont appliquées souvent en parallèle du MALDI-TOF et autres trousses commerciales d'identification afin de raccourcir le temps de rendu des résultats. Les produits amplifiés et séquencés sont comparés (outils BioEdit et Clone Manager) aux séquences des bases de données externes (NCBI) et de nos propres bases de séquences issues de l'étude de souches de référence pour constituer une banque de données internes. En cas de résultats discordants ou en cas de profil de résistance inhabituel, un séquençage génomique par WGS peut être entrepris. En effet, de nouvelles espèces de MNT sont régulièrement décrites et les bases de données génétiques et protéiques ne sont pas toujours à jour ni concordantes. C'est pourquoi les techniques de MALDI-TOF et de biologie moléculaire sont le plus souvent associées.
L'objectif pour la mandature prochaine **est de développer et évaluer** des méthodes pour **identifier les MNT directement à partir des prélèvements** positifs à l'examen microscopique et pour détecter les MNT avec des techniques aussi sensibles que celles détectant *M. tuberculosis*. Ceci aidera à identifier l'espèce et permettra de débuter la prise en charge du patient en attendant les résultats des cultures.
Nous avons déjà mis au point des protocoles de PCR en point final ou en temps réel basé sur l'amplification de gènes communs mais spécifiques aux mycobactéries (Radomski N. et al. 2010, 2014) et **testerons les performances** des trousses commercialisées de PCR multiplex remplaçant les PCR-hybridation sur bandelette pour identifier les espèces à partir de prélèvements BAAR+ et de cultures.

ETUDE DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES MONO, MULTI ET ULTRA RESISTANTES, Y COMPRIS VIS-A-VIS DES ANTI-INFECTIEUX NON UTILISES USUELLEMENT, EN DEVELOPPANT LES TECHNIQUES ADAPTEES, NOTAMMENT LES METHODES MOLECULAIRES DE DIAGNOSTIC RAPIDE

M. tuberculosis

Tests phénotypiques
- Les tests de sensibilité vis-à-vis des souches de *M. tuberculosis* seront faits en milieu liquide par la méthode MGIT® pour les antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine et pyrazinamide) en raison de l'arrêt de la commercialisation des réactifs permettant l'étude de la sensibilité des antituberculeux de première ligne en milieu solide par la méthode des proportions par Biorad. - Pour les **souches mono-résistantes à la rifampicine et les souches MDR** nous effectuerons un **antibiogramme « complet »** qui comprendra : les antituberculeux de première ligne (cf. ci-dessus) et les antituberculeux de seconde ligne. La sensibilité aux antituberculeux de seconde ligne sera déterminée en milieu solide par la méthode des proportions : fluoroquinolones (ofloxacine et moxifloxacine afin de détecter les souches résistantes à bas niveau à l'ofloxacine mais pour lesquelles le niveau résiduel de sensibilité à la moxifloxacine laisse espérer un bénéfice d'un traitement par cette fluoroquinolone), les antituberculeux injectables de réserve (amikacine, kanamycine et capréomycine), l'éthionamide, le PAS, la cyclosérine, le linézolide, **la bédaquiline, et le délamanide) et/ou en milieu liquide par la détermination de CMI par la méthode MGIT équipée du système TBeXist (**bédaquiline, clofazimine, délamanide, linézolide, prétomanide).
Cette dernière méthode combine l'automate MGIT960 de culture en milieu liquide et un logiciel informatique appelé Epicenter®TBeXiST (Tuberculosis - extended individual susceptibility testing) qui permet d'analyser, lors d'une même expérience, deux paramètres essentiels du test de sensibilité aux antituberculeux, (a) la mesure des proportions de mutants résistants et (b) la mesure des concentrations minimales inhibitrices. De plus, le logiciel permet une vision dynamique de la croissance bactérienne en présence d'antituberculeux jusqu'à positivité des témoins.
Tous **les milieux solides pour antibiogramme de 2ème ligne seront préparés et contrôlés localement** car non commercialisés, de même pour les solutions d'antibiotiques utilisées pour la détermination des CMI.

Enfin, nous continuerons à participer à l'évaluation des concentrations critiques par la méthode de référence proposée par l'EUCAST dans le cadre de notre participation au groupe mycobactéries de l'EUCAST (EUCAST-AMST).

Tests génotypiques

- Pour les **antituberculeux « piliers » du traitement standard** (**rifampicine, isoniazide)**, nous utiliserons en priorité le test **GenoType®MTBDR*plus***. Lorsque ce test ne détectera pas de mutation alors qu'il y a une très forte suspicion de résistance à l'isoniazide (ou à l'éthionamide, proche de l'isoniazide), l'exploration moléculaire sera complétée par une analyse Deeplex, et selon les cas par des séquençages ponctuels de gènes d'intérêt et/ou un séquençage du génome complet (WGS).

- **Pour les souches MDR**, nous utiliserons en priorité le test Deeplex Myc-TB® et le WGS. Ce test permet de déterminer la sensibilité à 13 antituberculeux de première et de deuxième ligne dans un délai rapide de 7 à 10 jours à partir de la réception de l'échantillon au CNR (souche ou prélèvement BAAR+ à l'examen microscopique). De plus, cette technique d'amplicons par séquençage à haut débit, permet d'obtenir de très grandes profondeurs de séquençage particulièrement intéressantes pour l'exploration de variants minoritaires dans la population de bacilles tuberculeux (seuil de 3%). Cependant, cette technique est ciblée, et n'est par conséquent pas exhaustive, et ne permet pas d'explorer la sensibilité génotypique au délamanide notamment. L'approche WGS permet d'apporter ces éléments, en explorant la totalité du génome de *M. tuberculosis complex*. En contrepartie, l'analyse est complexe et nécessite une solide expertise.

Notre approche peut être résumée sur le logigramme suivant pour les souches ou prélèvements qui nous sont adressés et pour lesquels il y a une forte suspicion de résistance à la rifampicine (Figure 2).

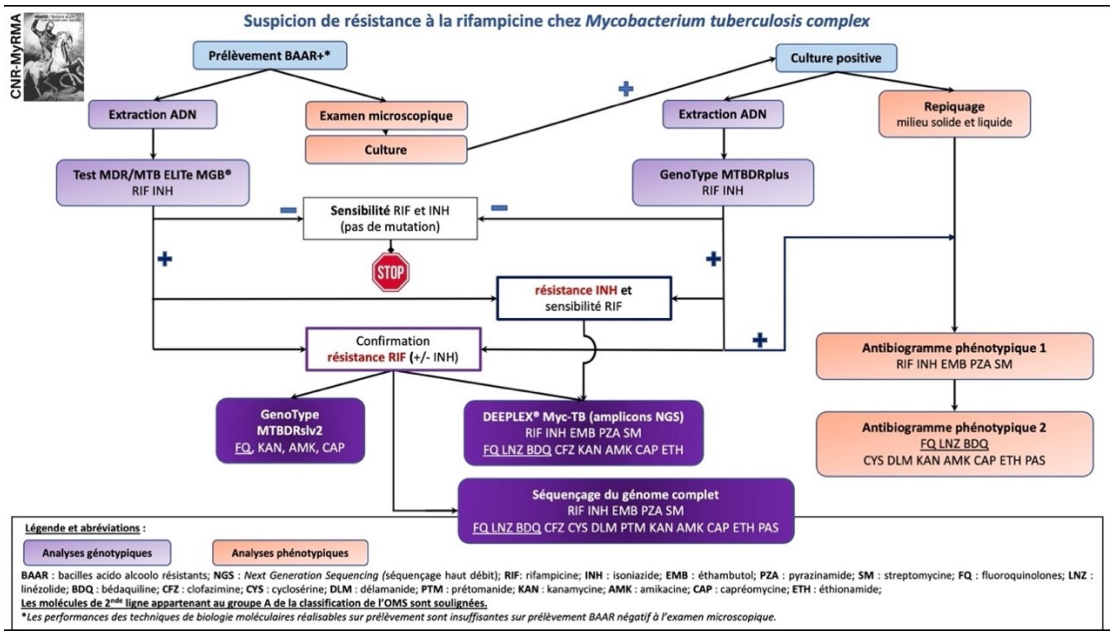

Figure 2 - Logigramme du CNR-MyRMA pour la prise en charge des prélèvements et souches suspects d'héberger des bacilles résistants à la rifampicine

- Pour le **pyrazinamide,** nous nous baserons en première approche sur le **séquençage complet du gène *pncA*** et de son promoteur, qui code pour la pyrazinamidase, activateur du pyrazinamide. En l'absence de mutation associée à la résistance identifiée, la sensibilité phénotypique du pyrazinamide sera contrôlée. En cas de résultat de nouveau résistant, une exploration approfondie sera réalisée par WGS, afin de rechercher des mutations dans les autres gènes candidats connus, tels que *panD* et *clpC1*.

- Pour **les souches monorésistantes à l'isoniazide**, nous effectuerons un antibiogramme génotypique complet par la méthode Deeplex® Myc-TB afin de confirmer la résistance à l'isoniazide et de tester la sensibilité génotypique aux fluoroquinolones dans le même temps (gènes *gyrA* et *gyrB*). La résistance aux fluoroquinolones des souches de *M. tuberculosis complex* sensibles à la rifampicine étant exceptionnelle en France (<1%), nous

avons choisi de ne plus tester la sensibilité phénotypique aux fluoroquinolones sauf situation particulière. Cette approche est résumée dans le logigramme suivant (Figure 3).

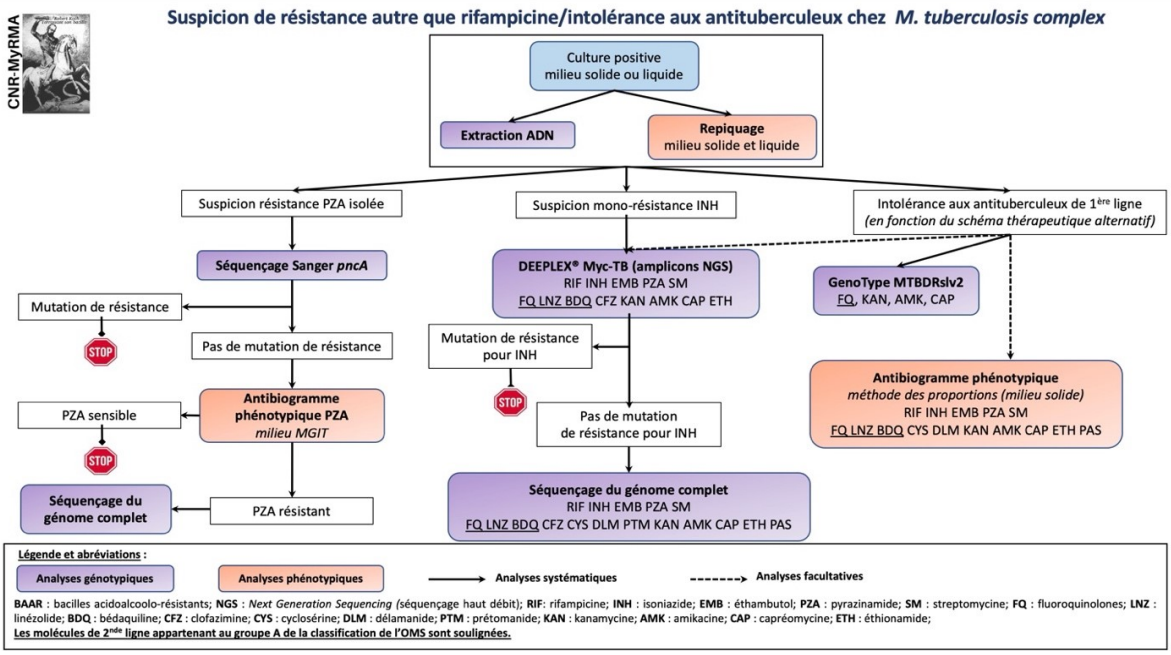

Figure 3 - Logigramme du CNR-MyRMA pour la prise en charge des prélèvements et souches suspects d'héberger des bacilles résistants à un autre antibiotique que rifampicine

- Les performances d'une nouvelle technique mise sur le marché et permettant de détecter l'ultrarésistance (ancienne définition) est en cours d'évaluation (Xpert MTB-XDR® - Cepheid). Selon les performances observées, une stratégie d'utilisation sera proposée aux laboratoires correspondants. Cette technique a l'avantage d'obtenir rapidement une évaluation de la sensibilité génotypique à l'isoniazide et aux fluoroquinolones pour les laboratoires qui utilisent déjà cette méthode pour déterminer la sensibilité génotypique à la rifampicine.

Mycobactéries non tuberculeuses

Chaque espèce de MNT a un profil de sensibilité aux antibiotiques propre correspondant au profil des souches sauvages. Des nouvelles espèces de MNT étant régulièrement décrites, nous devons définir qu'elle est le profil de chacune d'entre elles. C'est pourquoi l'identification et les tests de sensibilité aux antibiotiques sont faits systématiquement lors d'une infection à MNT. En effet, c'est la confrontation des résultats phénotypiques et génotypiques qui nous permet d'assurer notre expertise de CNR par rapport à des laboratoires experts qui, le plus souvent, maitrisent seulement l'un ou l'autre.

Tests phénotypiques

- Les antibiogrammes seront effectués sur les souches de MNT lorsque les informations cliniques et bactériologiques montreront que la situation répond aux critères d'infections recommandés (ATS). La feuille de renseignements que le CNR-MyRMA met à la disposition des demandeurs sur le site http://cnrmyrma.fr est conçue pour simplifier le recueil de ces informations.

Les tests de sensibilité seront faits selon les techniques suivantes :
- Mesure des CMI de clarithromycine, amikacine, rifampicine, la rifabutine, éthambutol, moxifloxacine et linézolide (microplaques SLOWMYCO® TREK) pour les espèces à croissance lente : complexe aviaire*, M. simiae, M. malmoense, M. scrofulaceum, M. kansasii* et *M. xenopi* .
- Mesure des CMI de clarithromycine, amikacine, tobramycine, éthambutol, moxifloxacine, ciprofloxacine, linézolide, doxycycline, minocycline, tigécycline, imipenème et céfoxitine en milieu liquide (microplaque

RAPMYCO® TREK) pour les espèces à croissance rapide. Ces plaques disponibles commercialement ont le label IVD. Bien qu'elles soient utilisées depuis de nombreuses années au CNR, elles ont besoin d'être révisées tant pour les antibiotiques à tester que pour leurs concentrations.
C'est pourquoi notre projet est de tester une plaque préparée avec les laboratoires ThermoFisher en RUO. Cette plaque comprendra les nouveaux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à MNT (ex. clofazimine, tedizolide, association de céphalosporines ou de carbapénèmes et d'inhibiteurs de betalactames comme l'avibactam et le relebactam, bedaquiline, …).
Nous participerons aussi au développement de la méthode de détermination des CMI par le groupe EUCAST-AMST pour les MNT, ce qui nous permettra d'assurer les meilleures conditions de tests in vitro pour prédire le succès ou l'échec des traitements personnalisés. Le travail sera mené **en collaboration avec le groupe EUCAST-AMST** pour calculer les CMI modales, CMI50, CMI90 et CMI95 (correspondant à la concentration dite « epidemiological cutoff » ou ECOFF) propres à chaque MNT. Ces concentrations serviront de base à la détermination de concentrations critiques ou « breakpoints » dans le cadre du sousgroupe EUCAST sur les antimycobactériens que nous présidons depuis 2016.

Tests génotypiques
La détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez les MNT sera basée principalement sur le séquençage des gènes

- (a) codant la résistance acquise (ex.*rrl* codant l'ARN 23S pour la résistance acquise aux macrolides (clarithromycine et azithromycine) et gène *rrs* codant l'ARNr16S pour la résistance acquise aux aminosides (amikacine et tobramycine), *rpoB* pour la résistance à la rifampicine chez certaines espèces (*M. kansassii*, *M. szulgai*), et *gyrA, gyrB pour la résistance aux fluoroquinolones.* (*M. fortuitum* complex)
- (b) codant des enzymes ou des protéines impliquées dans la résistance naturelle, en particulier les gènes *erm* codant la résistance aux macrolides (*erm(41)* chez *M. abscessus, erm(39)* chez *M. fortuitum*,..).

Nous utilisons en routine le test commercialisé GenoType NTM-DR® qui permet la détection génotypique des résistances recommandées dans les nouveaux "guidelines" 2020 pour le traitement des infections pulmonaires à MNT (Daley et al. 2020) et auxquelles nous avons participé. Ce test détecte les mutations *rrl* et *rrs* pour les principales espèces isolées : *M. avium* complex (comprend *M. avium, M. intracellulare* et *M. chimaera*), *M. chelonae* et *M. abscessus*, et permet aussi de différencier les sous espèces de *M. abscessus*, en donnant les résultats de de résistance naturelle aux macrolides liée aux sequevars du gène *erm*(41).
Notre stratégie est résumée dans le logigramme suivant (Figure 4).

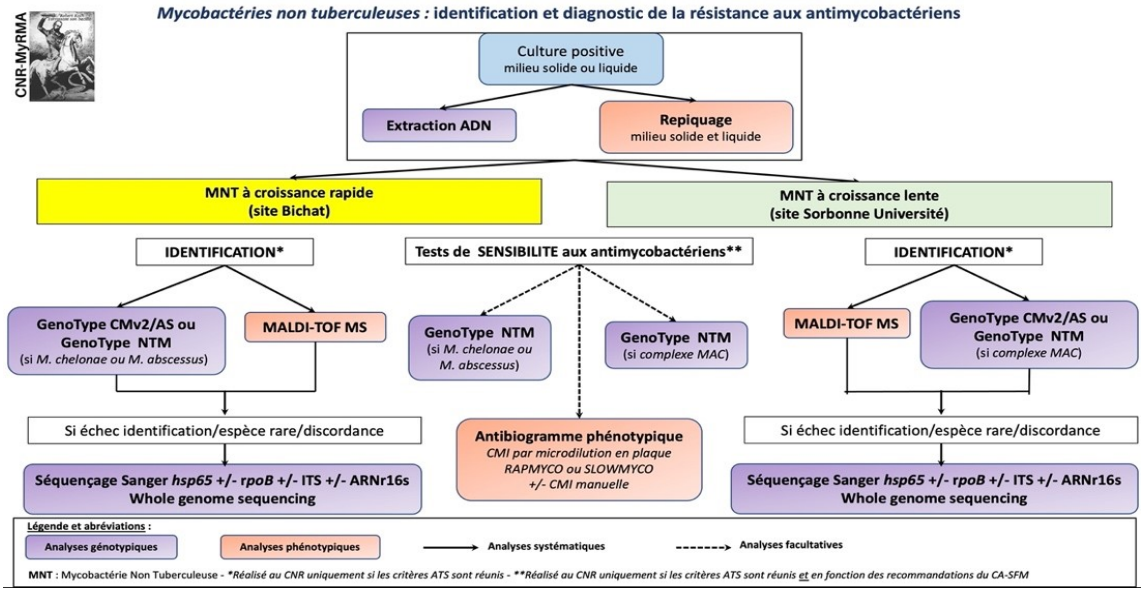

Figure 4 - Logigramme du CNR-MyRMA pour l'identification et de détermination de la résistance des mycobactéries non tuberculeuses

Notre projet est d'améliorer encore l'outil génotypique en ajoutant des gènes pouvant déterminer les résistances aux macrolides chez les espèces de plus en plus fréquentes comme *M. fortuitum* complex. En effet, les espèces de ce complexe sont pour certaines résistantes aux macrolides (*M. fortuitum* subsp. f*ortuitum* ont un gène *erm39*) et pour d'autres sensibles (*M. peregrinum*). Il existe aussi des mutations de résistance aux aminosides qui ne figurent pas dans le test GenoType NTM-DR®. Ces mutations (ex. gène *rrs* en dehors du hot spot 1408) pourraient être observées en rapport avec l'utilisation d'amikacine liposomiale inhalée.
Enfin l'étude des séquences génomiques par espèce nous permettra, en parallèle avec les études de CMI citées plus haut, de faire l'inventaire des gènes pouvant être impliqués dans la résistance acquise et naturelle des espèces les plus fréquentes et posant des problèmes thérapeutiques (*M. abscessus*, *M. chelonae*, ...).

Mycobacterium leprae

Nous réalisons depuis la mandature précédente, le diagnostic bactériologique des cas de lèpre suspectés dans les DOM-TOM ou en France métropolitaine chez les sujets ayant vécu dans les pays d'endémie en combinant (a) l'examen microscopique d'une biopsie cutanée prélevée par punch de 3 ou 4 mm sur une lésion typique, (b) une PCR spécifique d'espèce très sensible (ciblant les séquences répétées RLEP) et (c) une PCR multiplexe des gènes de résistance à la rifampicine, aux quinolones et à la dapsone. L'application de cette stratégie, que nous avions mise au point il y a quelques années, est maintenant facilitée par la commercialisation de la trousse GenoType LepraeDR® que nous avons contribué à concevoir avec un industriel allemand (Hain Lifesciences). Cette stratégie a été améliorée dans la mandature précédente par la mise au point d'une PCR temps réel quantitative de RLEP. Cette séquence étant répétée 35 à 37 fois dans le génome, la qPCR a une sensibilité d'environ 100 génomes/ml suspension après mix de la biopsie dans 2 ml de tampon de Hanks. Le protocole de détection a été standardisé avec plusieurs laboratoires experts internationaux (Institut tropical d'Anvers, Centre Charles Mérieux de Madagascar, CHU de Leiden aux Pays bas) avec des contrôles de qualité dont nous avons assuré l'organisation dans le cadre du projet EDCTP PEOPLE.

Notre stratégie est résumée dans le logigramme suivant (Figure 5).

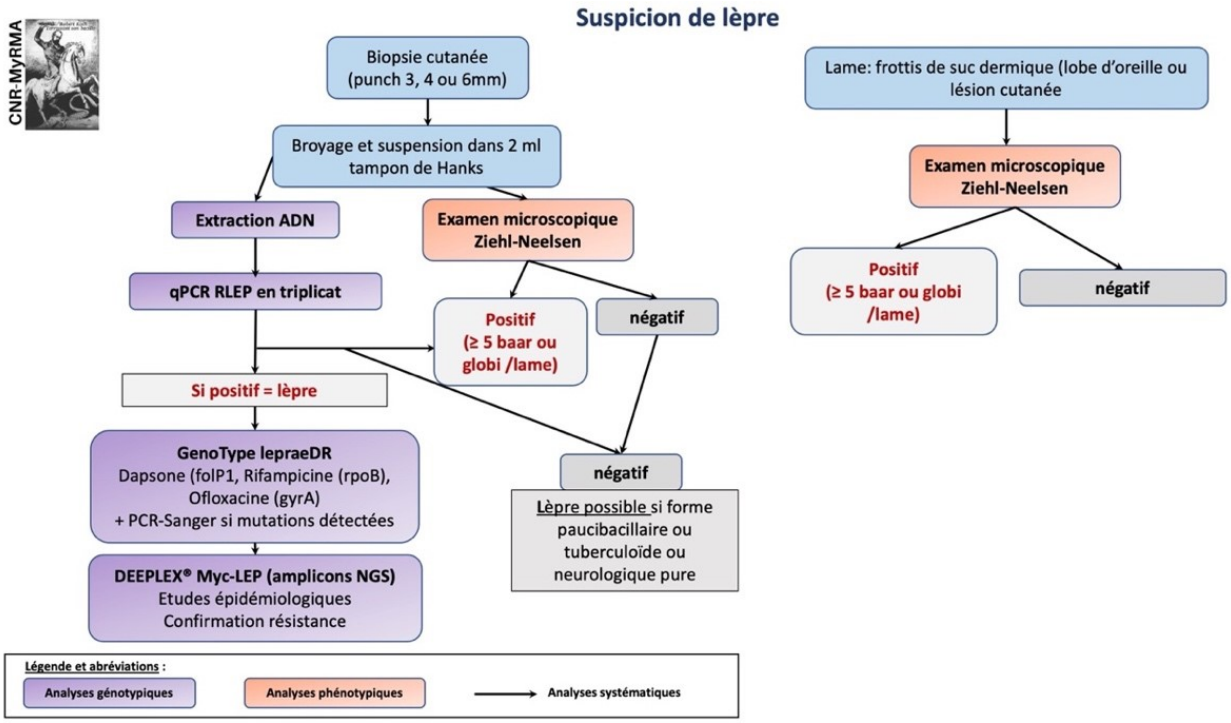

Figure 5 - Logigramme du CNR-MyRMA pour la prise en charge des prélèvements pour suspicion de lèpre

Méthodes permettant de suivre la viabilité des mycobactéries sous traitement

Les méthodes de visualisation des bactéries viables par microscopie en fluorescence nous a permis de montrer la diminution de la viabilité des Baar encore visible dans les crachats des patients tuberculeux en cours de traitement (Wyplosz et al. 2017). Nous allons tester le bénéfice clinique de l'utilisation systématique de cette technique dans le suivi des malades avec une tuberculose pulmonaire à examen microscopique positif dans le cadre du PHRC régional (ile de France) TBVISA (TuBerculosis Viability Interregional Study and Agreement on biological tests, URC Bicêtre, investigateur principal, Dr B.Wyplosz) qui comprendra l'inclusion de 104 patients dans une quinzaine de services de pneumologie, de maladies infectieuses ou de médecine interne de l'AP-HP. Ce PHRC avait été accepté en 2020 et devait avoir lieu en 2020 et 2021 mais la date de début a été repoussée à septembre 2022 du fait de la pandémie COVID-19.
Notre projet est aussi de mettre au point des méthodes moléculaires, si possible quantitatives, basées soit sur l'ARN, qui se dégrade rapidement lors de la mort cellulaire, soit sur l'ADN extrait de cellules viables par marquage spécifique. Des essais sont en cours. Les cinétiques de diminution de viabilité des bacilles seront établies pour des cas de tuberculose ou d'infection respiratoire à MNT à examen microscopique positif ou négatif, avant puis régulièrement en cours de traitement.

Développement du séquençage génome entier (WGS)

WGS et M. tuberculosis (laboratoire coordonnateur)
Le séquençage du génome entier (*Whole Genome Sequencing*, WGS) basé sur les technologies dites de Next Generation Sequencing (NGS) permet la détermination de la séquence complète du génome de *M. tuberculosis* (4,4 Mbases). Cette approche fournit une quantité d'information considérablement plus élevée que la technique MIRU-VNTR 24 loci. Par rapport au MIRU-VNTR, le WGS est beaucoup plus discriminant et offre une approche à très haute résolution qui permet de résoudre les fausses grappes (faux clusters) générées par le MIRU-VNTR, notamment pour les souches de la lignée Beijing.

Les données issues du WGS "routine" **seront adressées sous forme de compte-rendu synthétique** détaillant le résistotype et les mutations identifiées comme impliquées dans la résistance aux antituberculeux ou suspectées de l'être (cf. exemple en annexe (6) page 106) aux laboratoires demandeurs qui pourront accéder à leurs données génomiques, s'ils le souhaitent. Ce compte rendu synthétique, mis en place en 2022, sera mis à jour (en particulier la méthodologie employée) au fur et à mesure des nouveautés.

WGS et Mycobactéries non tuberculeuses (laboratoire associé)

Les connaissances des caractéristiques génomiques MNT sont beaucoup plus limitées que celles de *M. tuberculosis*. Depuis 2017 nous avons développé des techniques d'extraction génomique, de séquençage et d'analyses permettant de réaliser en routine le séquençage génomique des MNT. Nous étudions d'une part (a) la clonalité des souches en cas d'épidémies ou pour affirmer l'origine de contaminations, (b) des mécanismes de résistance acquise et naturelle aux antibiotiques, (c) la taxonomie de nouvelles espèces ou sous espèces et enfin (d) la présence des MNT dans des réservoirs environnementaux ou animaux et leur transmission à l'homme.
La technique est maintenant validée (voir Lecorche E; 2020 et 2021) et se fait principalement à partir de culture, puisque la culture est quasiment toujours possible dans les cas avérés d'infections à MNT. Les protocoles de séquençage ont un peu varié selon l'équipement à disposition (MiSeq, MiniSeq). Le logiciel d'analyse a été principalement Bionumerics version 7.6.3, et nous sommes en train d'installer la version 8.1. A ce jour, 248 génomes de MNT ont été produits et sont conservées incluant 78 *M. avium complex*, 62 *M. chelonae*, et *43 M. abscessus*. L'extraction étant principalement manuelle, nous allons tester différents extracteurs afin de pouvoir automatiser et standardiser la préparation des acides nucléiques pour le WGS.

4.1.3 Constitution, de stockage et mise à disposition des collections, en développant une collection de souches

Chacun des deux laboratoires du CNR assure le stockage des souches reçues dans le cadre de ses activités de CNR.

La description des méthodes de conservation et d'accès aux souches est donnée dans le chapitre 2.
Les démarches pour intégrer la collection au Centre de Ressources Biologiques de la Pitié-Salpêtrière n'ont pas abouti du fait de contraintes de place disponible auxquelles se sont ajoutées la surcharge de travail du CRB liée à la pandémie de covid-19. Une intégration est néanmoins toujours prévue à court terme, comme en témoigne le courrier de son responsable et de la cheffe du DMU BioGem, dont dépend le laboratoire et le CRB.
Le laboratoire associé a intégré le CRB de Lariboisière en 2019 (Directeur Pr Philippe Manivet, Biobank Lariboisière/Saint Louis - Centre de Ressources Biologiques ; biobank-lariboisiere.fr).

4.1.4 Projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires

Toutes les nouvelles techniques ou améliorations méthodologiques mises au point dans le cadre des missions du CNR seront portées à la connaissance des laboratoires pratiquant la mycobactériologie et **pourront faire l'objet de stages de formation** ou de travaux en commun (cf. par exemple ci-dessus « Identification des mycobactéries non tuberculeuses par spectrométrie de masse MALDI-TOF », test d'infection tuberculeuse VIDAS-TB IGRA, génomique, test de viabilité).

4.1.5 Possibilités de montée en charge des capacités du CNR

Les deux laboratoires ont des activités spécifiques dans le cadre de leurs missions de CNR. Etant donné la compétence des deux équipes, chaque laboratoire a la capacité de renforcer l'autre laboratoire en réponse à une demande accrue d'activité pour une demande très précise.

Le laboratoire coordonnateur de AP-HP.Sorbonne Université est une fédération de laboratoires sur deux sites. Actuellement, seul le site de la Pitié-Salpêtrière participe à la réalisation des analyses dans le cadre du CNR-MyRMA. Le site de Saint-Antoine qui appartient à la Fédération et qui est sous la responsabilité du Pr Nicolas Véziris, membre du CNR-MyRMA depuis de longues années dispose d'un laboratoire de sécurité L3 ainsi que de 2 praticiens hospitaliers et 2 techniciens de laboratoire qui réalisent les analyses de mycobactériologie pour 4 hôpitaux universitaires (Saint-Antoine, Tenon, Trousseau, Rothschild). Ce site a donc toutes les capacités pour être mobilisé à la demande ou en cas de difficultés techniques sur le site de la Pitié-Salpêtrière.

De plus, dans le cadre du réseau AZAY-Mycobactéries, les laboratoires de mycobactériologie de CHU sont mobilisables pour une première ligne d'expertise microbiologique et pour répondre à des demandes d'alertes.

4.2 Activités de conseil, formation et information

4.2.1 Appui méthodologique aux biologistes confrontés à des souches de M. tuberculosis et mycobactéries non tuberculeuses résistantes

Tuberculose

Le CNR-MyRMA est en relation directe avec les autres laboratoires de diagnostic, selon la stratégie validée dans les recommandations du Haut Conseil de Santé Publique pour la tuberculose multirésistante.

Dans le cadre de cet appui, nous proposons l'investigation de 16 gènes permettant de détecter rapidement (délai de 7-10 jours à compter de la réception de l'échantillon) la résistance à 13 antituberculeux grâce à la technique

Deeplex Myc-TB® (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide, éthambutol, fluoroquinolones, streptomycine, amikacine, kanamycine, capréomycine, éthionamide, linézolide, bédaquiline et clofazimine). Nous proposons de plus en plus souvent le diagnostic moléculaire de la résistance directement sur les prélèvements à examen microscopique positif ce qui permet d'avoir une bonne cartographie des résistances dès la première semaine suivant le diagnostic microscopique (voir Figure 2). Pour augmenter le nombre de cas pour lesquels les collègues nous envoient de tels prélèvements, nous comptons sur les nombreux enseignements assurés par le CNR-MyRMA, les nombreux appels téléphoniques reçus et sur les réunions du « Groupe thérapeutique ».

Nos tests de sensibilité phénotypiques reposent en grande partie sur des milieux de culture qui sont préparés localement car il n'y a pas, à ce jour, de milieux commercialisés permettant de tester la sensibilité des souches multirésistantes aux antituberculeux de 2ème ligne, y compris les plus récents (bédaquiline, délamanide et prétomanide). **La limite de ces tests phénotypiques est qu'ils donnent une réponse dichotomique « sensible ou résistant »** selon les critères OMS et non pas une mesure quantitative de l'activité des antibiotiques, de type CMI, qui permettrait d'identifier des souches de bas niveau de résistance pouvant quand même bénéficier de l'utilisation d'un antibiotique considéré comme résistant selon les critères OMS.
C'est pourquoi, pour les cas difficiles, nous proposons une technique en automate MGIT 960 (milieu liquide **en tubes fermés étanches** (sécurité acceptable) **équipé du système informatique TBeXiST qui permet une interprétation quantitative des tests**. Ce système impose quand même de préparer les solutions d'antibiotiques qui sont ajoutés aux tubes de milieu liquide au moment de l'ensemencement.

Mycobactérioses

Nous proposons (a) l'identification de l'espèce qui permet d'orienter vers un profil de sensibilité naturel aux antibiotiques qui varie beaucoup selon l'espèce, (b) les tests de sensibilité aux antimycobactériens, en particulier en cas de rechute c.a.d. de risque de sélection de mutant résistant (voir Figure 4).
Les tests de sensibilité sont d'abords génotypiques (clarithromycine, aminosides, rifampicine) puis phénotypiques selon des techniques choisies en fonction de l'espèce.
En cas d'infection liée aux soins (cas isolé ou épidémie), nous proposons l'étude de souches environnementales

Que ce soit pour *M. tuberculosis* ou les MNT, nous proposons aux collègues des laboratoires de les guider lorsqu'ils souhaitent pratiquer eux-mêmes les techniques ci-dessus :

- par contact direct
- **en les accueillant au laboratoire pour un stage pratique** (en moyenne 2 stagiaires présents tout au long de l'année)

4.2.2 Appui thérapeutique aux cliniciens/centre de lutte antituberculeuse

TUBERCULOSE

L'appui thérapeutique reposera sur :

- des **conseils téléphoniques directs** pour les cas les plus simples
- les Réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP), ou « TB-consilium France », organisées par le CNR-MyRMA à la Pitié-Salpêtrière et dont les activités sont centrées sur les cas de tuberculose MDR soumis par des collègues cliniciens. Les réunions se tiennent deux fois par mois à la Pitié-Salpêtrière et en vidéo-réunion et suivent une charte. Y participent l'équipe du CNR-MyRMA, des praticiens du sanatorium de Bligny, un pédiatre, des infectiologues, une spécialiste des dosages antibiotiques et une spécialiste des IRIS tuberculeux (liste disponible sur le site https://cnrmyrma.fr/2022/03/08/rcp-traitementdes-tuberculoses-complexes/). La liste des participants présents est établie lors de chaque réunion. Une bibliographie à jour est mise à la disposition des participants. Chaque réunion fait l'objet d'un compte rendu écrit pour chaque cas examiné, envoyé au collègue ayant soumis le dossier.

A titre d'exemple, 119 dossiers ont été discutés pour 96 patients au cours des 18 réunions de 2021, certains patients ayant fait l'objet de plusieurs présentations pour modification de traitement.

Au total, l'appui thérapeutique recommandé par le HCSP dans le cadre de la prise en charge d'un cas de tuberculose MDR est résumé par la figure suivante :

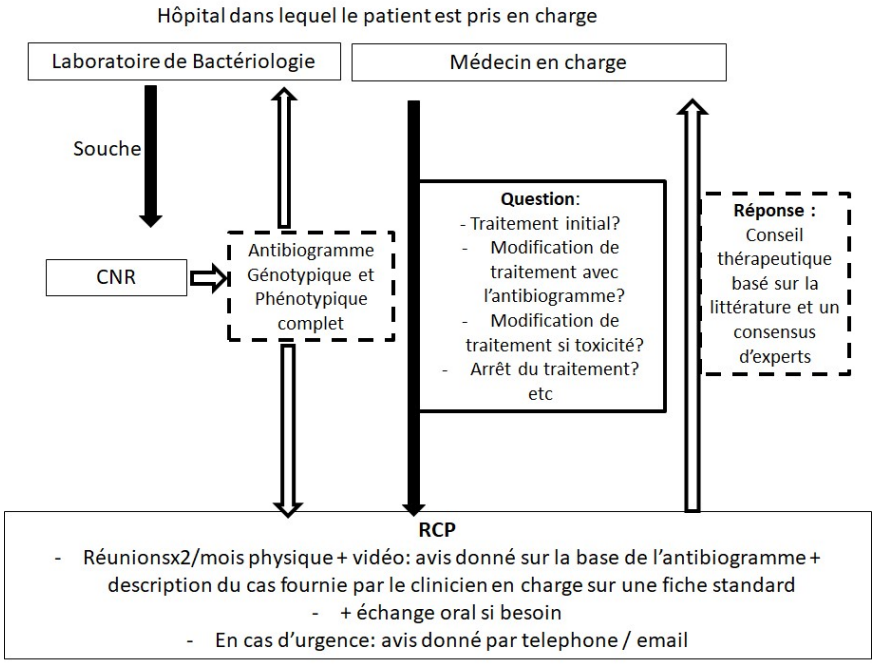

Figure 6 - Organisation de l'appui thérapeutique par le CNR-MyRMA dans le cadre de RCP

Durant la dernière mandature, les principales évolutions de ces RCP ont été l'augmentation de fréquence à 2 réunions par mois et l'utilisation de la vidéo-réunion. Pour la mandature à venir nous souhaitons développer l'intégration des avis via le registre afin d'améliorer la traçabilité des avis rendus.

MYCOBACTERIOSES

Les demandes de conseils concernant les mycobactérioses sont nombreux et les avis du CNR donnés par téléphone de manière non standardisée. C'est pourquoi, depuis la dernière mandature, nous avons mis en place une **RCP spécifique pour les mycobactérioses** pour rationaliser les activités de conseils et l'individualiser de la RCP tuberculose. Les cas de mycobactérioses sont en effet très variés en termes de circonstances médicales et épidémiologiques et d'espèce mycobactérienne en cause qui diffèrent beaucoup en termes de profils de sensibilité aux antibiotiques.
Ces RCP sont coordonnées par le laboratoire associé du CNR-MyRMA sur le modèle des RCP « tuberculose » de la Pitié-Salpêtrière, en vidéo-réunion, une fois par mois.
La liste des experts participants est donnée sur le site du CNR (https://cnrmyrma.fr/2022/02/05/rcpmycobacteries-atypiques-mnt/).

LEPRE

Pour répondre à des demandes fréquente de conseils pour les suspicions de **lèpre (**conditions de prélèvement, diagnostic**) et les lèpres complexes** (traitement et prise en charge), nous avons aussi mis en place une **RCP spécifique lèpre**.
Ces RCP **sont coordonnées par le laboratoire associé du CNR-MyRMA** également en vidéo-réunion, une fois par mois, en alternance avec les RCP mycobactériose.
La liste des experts participants est donnée sur le site du CNR (https://cnrmyrma.fr/2022/02/05/rcp-lepre/).

Les objectifs dans le cadre de ces RPC sont de mieux enregistrer les informations cliniques et les conseils donnés afin de mieux valoriser le travail fourni par l'ensemble des experts. Néanmoins l'organisation des RCP et la charge

de rangement et complétion des dossiers doivent être révisées pour la prochaine mandature en demandant une aide logistique aux Unité de Recherche Clinique des sites hospitaliers, qui possède une expertise sur ce type de management, et aussi pour être en règle avec les comités d'éthique lors de discussion des dossiers.

4.2.3 Projets de formation envisagés

Le CNR-MyRMA poursuivra ses activités de formation sur le plan national et aussi sur le plan international, en particulier européen.

Stagiaires
Le CNR-MyRMA reçoit des stagiaires dans plusieurs cadres différents :

- Biologistes et techniciens des laboratoires correspondants qui souhaitent se perfectionner en mycobactériologie
- Etudiants du DIU Tuberculose
- Internes en médecine et en pharmacie se spécialisant en Biologie médicale et en Microbiologie
- Stagiaires étrangers venant apprendre la (ou se perfectionner en) mycobactériologie
- Etudiants en BTS, DUT, master 1 ou 2 venant mener un travail personnel de recherche appliquée ou fondamentale sur les mycobactéries. Ces étudiants se répartissent dans les 2 laboratoires du CNRMyRMA et les équipes de recherche auxquelles ils sont adossés (cf. supra).

Formation initiale et continue
Le CNR-MyRMA continuera à participer à l'enseignement de la mycobactériologie dans une quinzaine de Diplômes universitaires et Interuniversitaires (DU et DIU), Masters et DES (Diplôme d'Enseignement Spécialisé en Biologie Médicale).

Conférences et symposiums
Les membres du CNR-MyRMA donnent de nombreuses conférences dans des congrès nationaux et internationaux.
Le CNR-MyRMA co-organise avec Santé Publique France et la Direction Générale de la Santé, tous les 2 ans, des journées scientifiques d'échange et d'information sur la tuberculose destinée aux professionnels des santé impliqués dans la lutte contre la tuberculose, en particulier aux praticiens des CLAT.

Guides
Le CNR-MyRMA a rédigé et actualise quand nécessaire le chapitre Mycobactéries du livre l'antibiogramme (ouvrage de référence sur le sujet) et participe aussi régulièrement à la rédaction d'articles didactiques dans des revues françaises ou étrangères.
Le CNR-MyRMA participe à la rédaction et à la révision régulière de plusieurs chapitres du « Tuberculosis handbook » publié par ERLN-TB (ESCMID).
Le CNR-MyRMA participe à la mise à jour des informations disponibles sur la tuberculose sur le site de Santé Publique France.

Recommandations
Le CNR recommande une liste des techniques (diagnostic/identification, sensibilité aux anti-infectieux...) par le CNR-MyRMA pour les laboratoires de Bactériologie médicale désirant pratiquer la mycobactériologie : microscopie, cultures en milieu solides et liquides, identification rapide de *M. tuberculosis* directement à partir des prélèvements lorsque l'examen microscopique est positif et dans les cultures, identification des MNT les plus fréquentes , tests de sensibilité aux antibiotiques de première ligne, recherche de mutation pour le diagnostic de la résistance à la rifampicine en cas de suspicion de multirésistance, tests de sensibilité pour les MNT.
Les logigrammes utilisés par le CNR sont mis à disposition des collègues par le biais du site internet du CNR.

Nous insisterons sur l'importance d'identifier les cultures positives <u>le plus rapidement possible</u> avec des techniques ne nécessitant pas de subculture et donc applicables dans tous les laboratoires pratiquant les primocultures (pas

de nécessité de disposer d'un confinement L3) : immunochromatographie, amplification génique suivie d'une hybridation réverse sur bandelette, amplification génique en temps réel avec hybridation sur sondes intégrées.
L'objectif est de pouvoir le plus rapidement possible fournir à ceux qui prennent en charge les patients, les éléments permettant de les guider et de mettre en place les mesures sanitaires adaptées (ex. isolement des patients, enquête dans autour du cas…).

4.2.4 Modalités de diffusion de recommandations et informations aux professionnels concernés et modalités prévues de rétro-information vers l'ensemble des partenaires du CNR (p.ex. création, développement d'un site internet dédié)

Le **site internet** http://cnrmyctb.free.fr créé il y a une quinzaine d'années bien que régulièrement mis à jour était basé sur une technologie vieillissante et était hébergé sur un serveur peu performant et peu souple.

Cet ancien site, encore disponible sur internet, va être remplacé d'ici peu par une nouvelle version utilisant des technologies plus récentes, utilisant des logiciels libres.
Cette nouvelle version en cours de finalisation est déjà aboutie et disponible à une adresse directement en rapport avec le sigle du CNR, https://cnrmyrma.fr.

Grace aux nouvelles technologies mise en place à cette occasion, nous espérons une meilleure réactivité, et une meilleure indexation sur les outils de recherche. Ceci permettra une meilleure diffusion des données du CNR et des informations et recommandations.
Ce site contient en téléchargement libre les rapports du CNR (PDF) depuis 2010.
La liste de l'ensemble des publications du CNR y est également disponible et mise à jour de manière dynamique avec les liens directement vers les revues en ligne.
Les informations importantes concernant les services rendus par le CNR, les RCP et les dates de celles-ci ainsi que les documents nécessaires sont disponibles.
Ce site est aussi 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.
Les membres du CNR-MyRMA diffusent très régulièrement les nouvelles recommandations et informations sur les avancées technologiques dans le cadre de réunions scientifiques.

4.2.5 Collaborations à des expertises éventuellement prévues auprès d'instances nationales ou internationales

Nous poursuivrons nos participations aux instances nationales et internationales, en particulier :

Instances nationales

- Direction générale de la santé et Haut conseil de la santé publique pour l'actualisation des recommandations en matière de tuberculose, mycobactérioses et lèpre.
- Santé Publique France et ANSM pour les évènements anormaux (gestion des alertes), en particulier les évènements liés aux soins.
- Mutuelle de Santé Agricole (MSA), Santé Publique France et la DGS pour la tuberculose animale.
- Institut thématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO-I3M de INSERM – AVIESAN) et ARNS-Maladies infectieuses émergentes (ANRS-MIE) créé récemment, pour l'élaboration des programmes d'action et de recherche.

Instances internationales

- OMS pour le pilotage du « Réseau OMS de surveillance de la résistance secondaire aux antilépreux » et Technical advisory group pour la mandature 2021-2024.

- ECDC pour participer au réseau des laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la CE (ERLTB-net).
- EMA (European Agency for Medicine) pour l'expertise bactériologique des nouveaux antituberculeux et la détermination des concentrations critiques.
- EUCAST (European Comittee for Antimicrobial Susceptibility Testing) pour diriger le sous-comité pour les mycobactéries.
- ESCMID comme membre du comité exécutif (E. Cambau) et comme président du **«** ESCMID study group for mycobacterial infections » (ESGMYC, L. Guglielmetti)
- LEP (associations des associations non gouvernementales contre la lèpre), membre du comité technique consultatif

4.2.6 Appui méthodologique international

Les membres du CNR-MyRMA participent au réseau européen ERLN-TB net, et collaborent avec l'OMS pour la tuberculose et la lèpre. Ils effectuent de nombreuses missions de coopération dans les pays du Sud.
Dans le cadre européen, nous sommes leaders pour proposer des méthodes de référence pour l'étude des antimycobactériens (antituberculeux, antilépreux et antibiotiques actifs sur les MNT). En tant que président du comité spécifique EUCAST-ASMT (antimycobacterial susceptibility testing), nous participons à l'élaboration, à la pratique expérimentale et à la validation des protocoles de référence. Ceci nous amène à rencontrer et travailler sous couvert de EUCAST et de l'EMA avec les industriels des nouveaux antimycobactériens.

Dans le cadre international, nous participons activement à tous les programmes de dépistage, de traitement et de prévention de la lèpre, en tant que membre du comité technique consultatif de l'OMS et des associations non gouvernementales qui luttent contre la lèpre (ILEP).

4.3 Contribution à la surveillance épidémiologique

4.3.1 Réseaux de partenaires

Comme pour les mandatures précédentes, nous proposons de poursuivre le travail de surveillance en s'appuyant **sur deux réseaux partenaires que nous nous efforcerons de pérenniser et animer,** bien que le contexte des laboratoires soit difficile après les deux années de crise Covid-19 qui se sont ajoutées à la pression de l'accréditation.

Le réseau Azay-Mycobactéries des laboratoires de CHU

Créé à l'origine pour des objectifs pédagogiques il y a une trentaine d'années par les Prs Jacques Grosset et Bernard Carbonelle, ce réseau est aujourd'hui piloté par le Pr Nadine Lemaitre, chef du service de Bactériologie au CHU d'Amiens.
C'est le réseau sur lequel le CNR appuie depuis 1995 ses activités de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bacilles tuberculeux. Le réseau compte 35 **laboratoires de CHU** couvrant toutes les régions métropolitaines sauf la Corse et les départements outre-marins, qui ont été sollicités mais qui n'ont pas encore répondu à la demande.
Une à deux réunions annuelles seront organisées pour présenter les résultats annuels du réseau et discuter de thèmes d'actualité (alerte infections à *M. chimaera* par exemple) ou de développement de nouvelles techniques.

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA a réuni sous la forme d'un réseau pérenne **l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie** ce qui permet la surveillance annuelle à visée exhaustive du nombre de cas de **tuberculose bactériologiquement confirmée** (culture positive). Ce réseau a connu une baisse constante et importante du nombre de laboratoires participant depuis son origine en raison des fusions de laboratoires et des arrêts d'activité de mycobactériologie des petits laboratoires. Dans la mesure du possible, le CNR a contacté les nouvelles structures ou s'est assuré que les laboratoires reprenant les activités de mycobactériologie participaient au réseau.
Les deux années de Covid-19 ont été associés à une baisse de la proportion de laboratoires répondants à l'enquête annuelle.

Les objectifs des années à venir seront de redynamiser ce réseau et démontrant son utilité aux participants afin d'assurer un retour d'information satisfaisant permettant d'avoir une autre source fiable pour compléter et renforcer eDO. Si le déploiement récent de eDO est un succès et que la qualité des informations est très satisfaisante, cela nécessitera de repenser les objectifs du réseau du CNR, en coordination avec Santé Publique France.

Les membres du CNR-MyRMA participent aux activités du groupe de travail du Mycomed de la SFM, que ce soit dans le cadre d'activités de surveillance ou de travaux scientifiques mais aussi de son congrès annuel.

4.3.2 Modalités de surveillance de la résistance aux anti-infectieux

Surveillance des mécanismes de résistance

La surveillance des mécanismes de résistance et de leurs caractéristiques (évolution de leurs répartition, liens entre eux dans le cadre de la multirésistance, émergence de nouveaux types) sera basée sur l'investigation génétique systématique de toutes les souches résistantes (*M. tuberculosis*, MNT, *M. leprae*) reçues au CNR.

Surveillance des cas de tuberculose résistante

La surveillance des cas de tuberculose résistante s'appuiera sur les données des deux réseaux partenaires, les informations recueillies pendant les RCP ainsi que celles adressées aux laboratoires du CNR-MyRMA par le biais des fiches d'information adressées avec chaque souche ou prélèvement. Les sources multiples permettent d'assurer une complétude très satisfaisante des données

La surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux s'appuiera sur la collaboration volontaire des laboratoires hospitalo-universitaires du réseau AzayMycobactéries décrit ci-dessus. La surveillance assurée à travers ce réseau est standardisée, en particulier pour ce qui est du recueil des informations cliniques et des résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques de première ligne.
La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis publiés qui ont montré que la sensibilité du réseau et la concordance des données avec celles de la DO étaient satisfaisantes. **Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~1.800 cas de tuberculose /an.**

La surveillance annuelle à visée exhaustive de la tuberculose multirésistante s'appuiera sur l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie (150 en 2020) réunis au sein du réseau CNR-MyRMA. Nous recueillerons le nombre de cas de tuberculose bactériologiquement confirmée (dénominateur) et, parmi ces cas, le nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine (MDR) (numérateur), ce qui permettra de calculer les taux. Ce réseau permet de recueillir des informations sur >4.200 cas de tuberculose /an.

4.3.3 Contribution à la surveillance de la méningite tuberculeuse, de la tuberculose à M. bovis, des mycobactérioses et de la lèpre

Méningite tuberculeuse

La surveillance annuelle à visée exhaustive du nombre de cas de méningites **tuberculeuses** chez les enfants de ≤ 5ans, indicateur important pour le suivi de la politique vaccinale par le BCG, est menée depuis 2000 par le CNR-MyRMA avec l'aide du réseau des laboratoires de mycobactériologie (cf. ci-dessus). **Les données seront régulièrement croisées avec celles de eDO en collaboration avec Santé Publique France**.

Mycobactérioses

Nous ne menons pas de surveillance systématique des mycobactérioses**. Cependant nous regardons de près la répartition des souches de MNT reçues** au CNR par espèce, âge, circonstances d'isolement et région.

Nous porterons une attention spécifique :

- aux cas d'adénites à MNT chez les enfants de ≤ 5ans, indicateur important pour le suivi de la politique vaccinale par le BCG,
- aux cas d'infections associés aux soins (endocardites, infections post-chirurgicales…) - aux cas groupés d'infections causées par la même MNT.

Si un phénomène nouveau se produisait en matière d'infections à MNT, nous pourrions mener des enquêtes spécifiques via nos 2 réseaux partenaires.

Lèpre

Nous motivons régulièrement nos interlocuteurs des DROM (Mayotte, Nouvelle-Calédonie, Antilles …) et nos collègues cliniciens et microbiologistes de métropole pour qu'ils pensent à confirmer bactériologiquement les suspicions de lèpre. Ceci nous permet de recevoir de nombreuses biopsies (une centaine par an) ce qui amène à confirmer le diagnostic d'une 30aine de cas de lèpre chaque année (un peu plus de 1/2 dans les DROM, un peu moins de 1/2 en métropole chez des migrants de pays où la lèpre est prévalente. Les cas font l'objet d'une surveillance génotypique de la résistance aux antilépreux et phylogénique.
Depuis 2018, nous rapportons annuellement au ministère de la Santé et à l'OMS (global leprosy programme) les nouveaux cas et les rechutes diagnostiqués chez des patients vivant en métropole. Ceci a fait en sorte que la France apparaisse enfin dans le bulletin annuel de l'OMS http://www/who.int/wer2020,95(36):417-440). Les cas des DOM-TOM sont déclarés à l'OMS selon leur région (AFRO pour la Réunion, AMRO pour les antilles et la guyane, …) sauf Mayotte qui n'est pas considérée comme un territoire français et dont les cas ne sont pas non plus déclarés par les Comores.

Tuberculose *à M. bovis*

Cette surveillance s'effectuera par deux voies complémentaires :

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

Un projet de surveillance plus systématique est envisagé pour décrire les caractéristiques des cas identifiés par les 2 voies ci-dessus : région, âge, métier (lien avec les animaux), pays de naissance… (voir projet).

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

Nous proposons de réaliser la comparaison des souches isolées de cas suspects d'être liés ou de patients et d'environnement (MNT) dans les circonstances suivantes :

***M.tuberculosis* complex**

- Suspicions de tuberculose nosocomiale ou de transmission dans des familles ou des collectivités, pour lesquelles le génotypage complète l'enquête épidémiologique « autour d'un cas » réalisée par les ARS et les Services de lutte antituberculeuse (SLAT),
- Suspicions de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- Suspicions de contamination inter-prélèvements au laboratoire,
- Etude systématique des souches des cas de tuberculose à bacilles multirésistants.

Notre objectif est d'utiliser le WGS (distance en nombre de SNVs par *pairwise comparison*), en transition avec le MIRU-VNTR 24 loci. En effet, le WGS est la technique possédant le plus grand pouvoir de résolution, alors que le MIRU-VNTR 24 loci, bien que complété par l'analyse des MIRU hypervariables, n'est pas assez discriminant,

notamment pour certains clusters de la lignée Beijing. Nous avons amorcé l'utilisation du WGS pour la comparaison systématique des souches multirésistantes ("approche *sequence first*"), étant donné que nous avons accumulé un nombre conséquent de génomes de souches multirésistantes sur les cinq dernières années. Nous **complétons l'étude des souches par** : (a) les caractéristiques des souches (phénotype et génotype de résistance) et (b) les caractéristiques des patients (pays de naissance, ville où le diagnostic a été fait, liens familiaux). Cette stratégie est résumée dans le logigramme Figure 7.

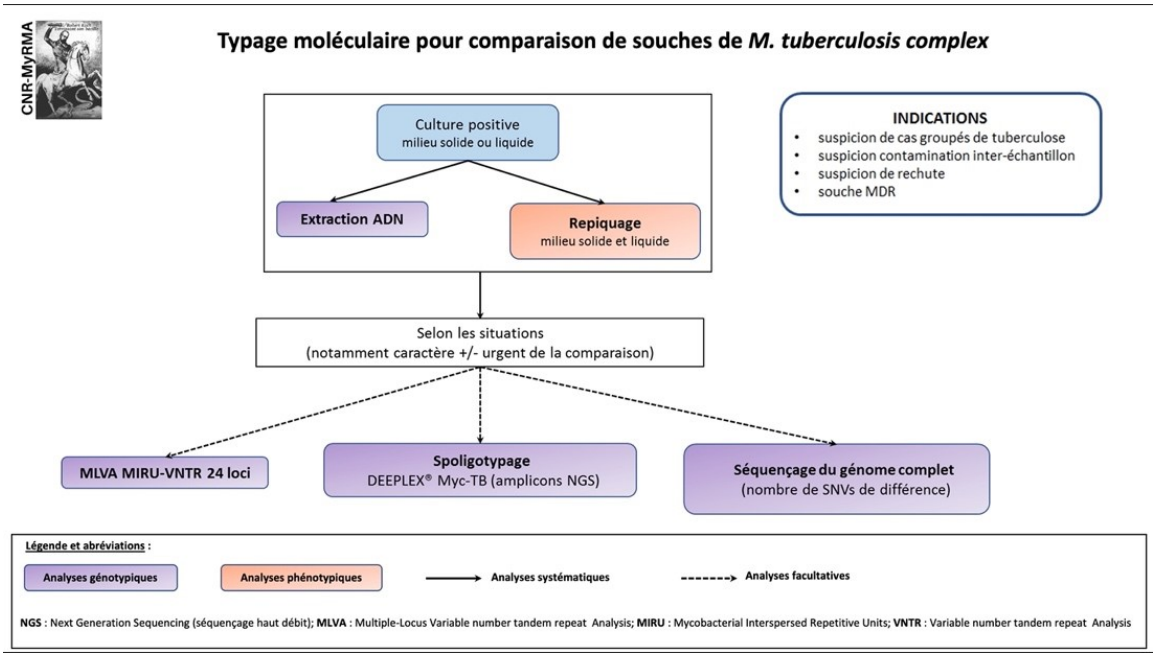

Figure 7 - Logigramme du CNR-MyRMA pour le typage moléculaire des souches de M.tuberculosis

Nous avons également pour objectif de contribuer à la surveillance des chaînes de transmission de la tuberculose, notamment multirésistante, sur le continent européen, en participant au projet EpiPulse de l'ECDC par la transmission de fichiers fastQ.

Mycobactéries non tuberculeuses

- en particulier dans un contexte iatrogène ou associé à des soins esthétiques (tatouage, hydrothérapie ...) - enquêtes visant à identifier la source de contamination, en lien avec les autorités sanitaires : comparaisons des souches des patients entres elles et avec celles isolées dans l'environnement.
Les méthodes utilisées sont à ce jour le WGS mais il est possible que la spectrométrie de masse (MALDITOF), grâce à l'étude spécifique des lipides, contribue à la distinction des souches (Figure 8).

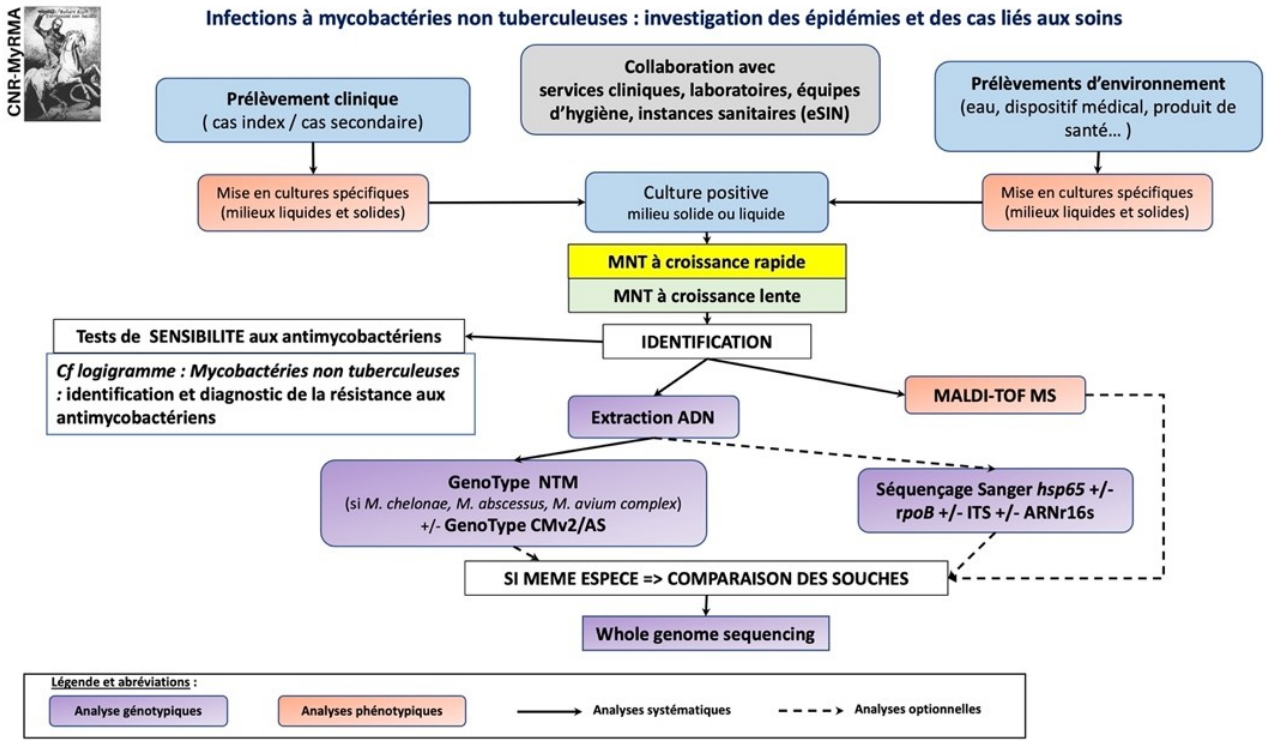

Figure 8 - Logigramme du CNR-MyRMA pour le typage moléculaire des souches de mycobactéries non tuberculeuses

4.3.5 Contribution à la surveillance des issues de traitement des cas de tuberculose à bacille multi-résistant et à l'amélioration de la description du suivi des patients

L'objectif est de suivre et documenter le devenir des patients atteints de tuberculose multirésistante (TB-MDR) en France, dont le parcours de prise en charge est souvent long et sinueux. Les dossiers du « Groupe Thérapeutique des tuberculoses de traitement difficile » du CNR MyRMA (cf. chapitre information, formation, conseil) concerne surtout la mise au traitement et les modifications du traitement mais rarement le devenir des patients à moyen terme.
Le principe est d'enregistrer les modalités de prise en charge, de réunir les informations cliniques, bactériologiques, génomiques jusqu'à l'issue de leur traitement ainsi que les informations sur le devenir des patients durant deux ans après le début du traitement.

Pour cela, nous avons conçu **un système de registre permettant la gestion de l'information des dossiers** de chaque cas de TB-MDR, simple et confidentiel et adapté à l'enregistrement et au suivi des données cliniques, biologiques, thérapeutiques, incluant la tolérance aux traitements des tuberculoses MDR en France.
Grâce à l'appui d'un financement partiel de la DGS nous avons **réalisé un logiciel de gestion informatisé partageable** entre les acteurs (cliniciens en charge des patients, laboratoire, CNR-MyRMA, groupe thérapeutique du CNR-MyRMA) avec la société Epiconcept sur le logiciel Voozanoo®.

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

système de consultation et d'export des données (chaque site utilisateur peut exporter les données qu'il a stockées, et consulter toutes les données concernant les patients pour lesquels il est intervenu).

Des fonctionnalités supplémentaires sont en cours de développement *ad hoc* ou programmées par la société prestataire : rappels électroniques vers le médecin responsable du patient; tableaux synthétiques des cas (nombre, dates, lieux…) destinés régulièrement aux acteurs du système de santé (Santé Publique France, DGS…) et aux services cliniques prenant en charge les patients; tableaux détaillés de résumé des cas individuels pour faciliter les discussions en RCP.

Le registre est maintenant utilisé en routine pour les cas discutés par le groupe thérapeutique du CNR-MyRMA en RCP. L'objectif est d'élargir l'inclusion des cas à tous ceux qui sont pris en charge dans les hôpitaux de l'AP-HP et au Sanatorium de Bligny. Cette augmentation de l'activité **nécessitera de disposer d'un temps d'attaché de recherche clinique évalué à une vacation/semaine.** Cela permettra aussi d'inclure rétrospectivement dans le registre les données, et en particulier les issues de traitement, des cas traités en France entre 2006 et 2019.

4.3.6 Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux, avec Santé Publique France

Tuberculose

En participant activement à la complétude des données des cas de tuberculoses à bacilles MDR dans le cadre de eDO nouvellement mis en place, le CNR contribuera à la qualité des données adressées à euroTB et à WHO-Europe pour la surveillance internationale de la résistance aux antituberculeux de premières et seconde ligne.

Par ailleurs, des informations sur la structure des laboratoires de mycobactériologie en France ainsi que sur leurs capacités techniques qui sont recueillies à travers le réseau du CNR sont fournies annuellement à l'ECDC et WHO-Europe.

Les **données** de **génotypage des souches MDR seront envoyées à l'ECDC (réseau ERLN-TB des CNR européens) et intégrés au rapport de l'ECDC** (cf. publication de 2016 : http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/multidrug-resistant-tuberculosis-molecular-typingsurveillance.pdf).
Nous enverrons aussi au réseau ERLN-TB, dès que disponibles, les séquences des génomes complets des souches MDR (cf projet WGS).

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

Lèpre

Nos résultats de surveillance de la résistance aux antilèpreux seront rapportés au réseau de surveillance OMS et au ministère de la santé pour publication annuelle dans le WER.
Nous pourrions, de plus, confronter, avec l'aide de Santé Publique France, les cas de lèpre des DROM à ceux ds déclarés à l'OMS par les pays limitrophes, ceci en particulier pour les DOM de l'Océan Indien (Mayotte, Ile de la Réunion) qui sont très proches de deux pays endémiques (Comores et Madagascar). En effet, nous avons constaté que les cas de Mayotte ne sont déclarés dans aucun système (ni par nous, ni par AFRO).
Nous avons aussi accepté un partenariat avec la DRAS de Nouvelle Calédonie pour le suivi des cas diagnostiqués sur ce territoire. Une mission de sensibilisation sur la lèpre sera effectuée avec eux en 2023.

Mycobactérioses

Nous participerons aux actions de surveillance menés par l'ECDC sur les infections à MNT comme nous l'avons fait en 2015-2020 sur les infections à *M. chimaera* post chirurgicales, et les endocardites à MNT depuis 2018.

Enquête sur les mycobactérioses liées aux soins

Notre projet est d'aider à réunir des informations épidémiologiques et circonstancielles sur les cas d'infections à MNT associés aux soins, afin de repérer des dispositifs ou des gestes à risque.
Nous proposons de croiser régulièrement les informations sur les cas liés aux soins que nous obtenons à travers nos activités d'expertise avec celles que Santé Publique France recueille dans le cadre des signalements des infections nosocomiales (esin). Ceci nous a permis de faire l'investigation de 85 cas d'infection à MNT liées aux soins entre 2012 et 2020 (voir publication Daniau C et al. 2022). Dès que nous avons connaissance d'un cas éventuel d'IAS, nous incitons la déclaration auprès de SPF afin de pouvoir ensemble conduire les investigations le plus rapidement possible après l'observation du cas.

4.4 Contribution à l'alerte

Nous sommes en relations régulières avec Santé publique France, avec l'équipe en charge de la tuberculose (Jean-Paul Guthmann), et avec celle en charge des infections liées aux soins et de la résistance aux antibiotiques (Anne Berger-Carbonne).

Nous signalerons les événements inhabituels tels qu'une augmentation du nombre de souches reçues suggérant l'émergence ou l'augmentation d'un type particulier de cas :

- souche de résistance particulière,
- espèce peu fréquente ou inhabituelle : *M.bovis*, MNT…
- site d'infection particulier : méningite, infection du site opératoire, adénite de l'enfant…
- circonstances de survenue particulière : iatrogénie (mésothérapie, acupuncture, ….), épidémie à MNT supposée à réservoir commun (piscines, établissements de santé…)

Nous **relaierons aussi les appels provenant de nos correspondants** (réseaux) et qui constitueraient des signaux justifiant une analyse de la situation.

Nous participerons aux réunions de crise liées à des alertes qui entre dans nos champs d'expertise et provenant des différentes instances nationales ou européennes aux coté de Santé publique France et de la DGS.